



Analyse écophysiological et génétique de l'absorption d'azote post-floraison chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) en relation avec la concentration en protéines des grains

François Taulemesse

► To cite this version:

François Taulemesse. Analyse écophysiological et génétique de l'absorption d'azote post-floraison chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) en relation avec la concentration en protéines des grains. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22581 . tel-01229768

HAL Id: tel-01229768

<https://theses.hal.science/tel-01229768>

Submitted on 17 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***
N° d'ordre : 669

Thèse :

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(SPÉCIALITÉ : PHYSIOLOGIE ET GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRES)

soutenue le : 16 juin 2015

FRANCOIS TAULEMESSE

**Analyse écophysiologique et génétique de l'absorption
d'azote post-floraison chez le blé tendre (*Triticum aestivum*
L.) en relation avec la concentration en protéines des
grains**

Directeur de thèse : Jacques LE GOUIS, *Directeur de recherche, INRA - Clermont-Ferrand*
Encadrant : Vincent ALLARD, *Chargé de recherche, INRA - Clermont-Ferrand*
Président du jury : Christophe TATOUT, *Professeur, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand*
Rapporteurs : Bertrand HIREL, *Directeur de recherche, INRA - Versailles*
Jean-Christophe AVICE, *Professeur, Université de Caen Basse Normandie*
Examineurs : Pierre ROUMET, *Chargé de recherche, SupAgro - Montpellier*
David GOUACHE, *Chef de services biotechnologies, Arvalis-Institut du
Végétal - Boigneville*

Remerciements

Ce manuscrit marque l'aboutissement d'un projet de longue haleine. C'est dans un mélange de sentiments de satisfaction, de mélancolie et de gratitude que je vais m'attacher à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ces travaux, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Je demande par avance aux oubliés de bien vouloir m'excuser.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci aux membres de mon comité de thèse, qui m'ont aidé à recentrer mes recherches.

Je remercie également Arvalis - Institut du Végétal qui a accepté de soutenir financièrement ce projet, et particulièrement Laurent Guerreiro et David Gouache pour leur implication et leurs conseils avisés.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à mes maîtres, Jacques Le Gouis et Vincent Allard, qui ont suivi et guidé mes travaux tout au long de cette thèse. Leur expérience, leur disponibilité et leur patience m'ont été d'une aide inestimable. Vous avez été pour moi d'excellents encadrants, complémentaires dans l'enthousiasme et dans la sagesse. J'ai beaucoup appris en travaillant à vos côtés.

Joëlle, pour ton énorme implication dans les expérimentations, pour ta gentillesse. Je ne te remercierai jamais assez.

Bernard, pour ton application, pour ton savoir-faire technique sans lequel le système de culture semi-hydroponique n'aurait probablement pas été à ce point abouti.

David, pour ton aide précieuse et tes compétences en instrumentation et régulation automatique.

Antoine et Julien pour votre participation sérieuse à la dernière campagne expérimentale.

Rémi, pour ton aide lors des longues journées passées au laboratoire.

Jean-Louis et Pascal pour la mise en place de l'expérimentation conduite au champ.

Séverine, pour ton organisation et tes conseils en biologie moléculaire.

Christine, merci pour les informations pertinentes relatives au développement du grain.

Merci aux plateformes CPCC et *Gentyane* de l'INRA de Clermont-Ferrand pour la mise à disposition des infrastructures expérimentales et des outils de biologie moléculaire.

Merci à Yves, Patricia et Dûyen de la plateforme Métabolome-Fluxome de l'INRA de Villenave-d'Ornon pour les dosages de métabolites et votre accueil chaleureux.

Merci à, Nicole, Boris, Renaud, Matthieu, Sophie, Marion et Allan pour les moments de détente autour des « pauses café ».

Pour finir, Julie, merci pour ta patience...

Résumé

Analyse écophysiological et génétique de l'absorption d'azote post-floraison chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) en relation avec la concentration en protéines des grains

La concentration en protéines des grains est un critère qualitatif majeur qui conditionne la valeur économique et technologique du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Cependant, la forte relation négative existant entre concentration en protéines et rendement en grains implique que l'amélioration de la concentration en protéines par une approche génétique soit complexe à atteindre sans impacter négativement le rendement. Pour contourner cette difficulté, il a été proposé qu'une sélection variétale basée sur l'écart à cette relation négative (nommé Grain Protein Deviation ; GPD) permette d'améliorer la concentration en protéines indépendamment du rendement. Au niveau physiologique, le GPD est fortement corrélé à la capacité des génotypes à absorber de l'azote après floraison indépendamment de la quantité d'azote déjà absorbée à floraison, suggérant que la satiété en azote soit à la base de son établissement. Envisager une sélection sur la base du GPD nécessite cependant d'acquérir des connaissances approfondies des mécanismes impliqués dans la régulation de l'absorption d'azote par la satiété en azote, qui permettraient de cibler précisément des traits simples à quantifier et robustement associés à cette capacité accrue d'accumulation de protéines dans les grains.

Cette étude se base sur deux expérimentations conduites en conditions contrôlées et une expérimentation au champ. Dans chacune de ces expérimentations, différents niveaux de fertilisation ont été appliqués en pré-floraison afin d'obtenir des statuts azotés contrastés à floraison. L'effet du statut azoté à floraison sur l'absorption post-floraison a ensuite été observé dans différentes conditions de disponibilités d'azote après floraison. Des mesures physiologiques et moléculaires ont été réalisées en parallèle des mesures d'absorption d'azote.

Nous avons mis en évidence que l'absorption d'azote post-floraison présente une dynamique élaborée qui suppose qu'elle est soumise à des régulations complexes. Parmi celles-ci, le statut azoté des plantes à floraison conditionne en grande part la quantité d'azote absorbée dans les jours qui suivent la floraison ($PANU_{\text{précoc}}$, de floraison à floraison + 250 degrés-jour). La quantité de $PANU_{\text{précoc}}$ se présente comme un déterminant fort de la concentration en protéines des grains du fait de la forte corrélation positive observée entre ces deux traits en conditions contrôlées et au champ, et ce indépendamment du niveau de rendement. L'étude de deux génotypes robustement contrastés pour le GPD a montré qu'à statuts azotés équivalents, la quantité de $PANU_{\text{précoc}}$ est sujette à des effets génétiques qui tendent à confirmer l'impact de la variabilité génétique de satiété en azote sur l'établissement du GPD.

Ces travaux ont permis de proposer des marqueurs du GPD potentiellement valorisables en sélection. Au niveau physiologique, la croissance des tiges après floraison se présente comme un marqueur prometteur du GPD car ce trait est fortement corrélé à la $PANU_{\text{précoc}}$. Au niveau moléculaire, la concentration en nitrates des racines, également soumise à des effets génétiques, est proposée comme marqueur potentiel du fait de son rôle probable dans la régulation expressionnelle des gènes impliqués dans l'absorption et l'assimilation d'azote.

Mots-clés : absorption d'azote, concentration en protéines, nitrate, satiété, transporteurs racinaires, *Triticum aestivum* L.

Abstract

Ecophysiological and genetic analysis of post-flowering nitrogen uptake in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation with grain protein concentration

Grain protein concentration is one of the major qualitative criteria of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) economic and technological value. However, the negative relationship existing between protein concentration and grain yield implies that grain protein concentration improvement is complex to achieve without detrimental effect on grain yield. Breeding programs based on the deviation to this negative relationship (Grain protein deviation of GPD) have been proposed to be a suitable strategy to improve grain nitrogen concentration without detrimental effects on yield. At a physiological level, GPD is strongly correlated with genotypes aptitude to uptake nitrogen after flowering independently of the nitrogen amount already taken up before this stage, suggesting that satiety for nitrogen could be involved in its establishment. Breeding for GPD implies however a more detailed knowledge of the processes implied in nitrogen uptake regulation by nitrogen plant satiety. This would allow targeting traits both simple to measure and robustly associated with this increased capacity to accumulate proteins in grains.

The present study is based on two experiments carried on under controlled conditions and a third led under field conditions. In all experiments, various levels of pre-flowering fertilization were applied in order to obtain contrasted plant nitrogen status at flowering. Nitrogen status effect on post-flowering nitrogen uptake was observed under various post-flowering N availability conditions. Physiological and molecular measurements were carried out in parallel with uptake measurements.

We highlighted that post-flowering nitrogen uptake has an elaborate dynamic, suggesting the involvement of complex regulations. Among these, plant nitrogen status at flowering determines to a great extent the amount of nitrogen taken up during the days following flowering (early PANU, from flowering to flowering +250 °C.days⁻¹). Early PANU appears to be a strong determinant of grain protein concentration, as strong positive correlations were observed between these two traits both under controlled conditions and field conditions, independently of grain yield level. The study of two genotypes strongly contrasted for GPD highlighted that, despite comparable N status, early PANU is subjected to strong genetic variations which tend to identify N satiety as a determinant of GPD.

The present study identified robust markers of GPD of potential use in plant breeding. At a physiological level, post flowering stem elongation appears to be a promising marker of GPD since this trait is strongly correlated with early PANU. At a molecular level, root nitrate concentration, a trait submitted to genetic variations, is also proposed as a marker of GPD because of its role in the expression regulation of the genes governing nitrogen uptake and assimilation.

Keywords: grain protein concentration, nitrate, nitrogen uptake, satiety, root transporters, *Triticum aestivum* L.

Sommaire

Chapitre 1. Introduction générale	1
Références	3
Chapitre 2. Synthèse bibliographique	4
I Le blé tendre (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	4
1.1. <i>Eléments phylogéniques</i>	4
1.2. <i>Eléments botaniques</i>	4
1.3. <i>Histoire évolutive du blé</i>	8
1.4. <i>Eléments contextuels</i>	10
II Qu'est-ce que la qualité du blé ?	13
2.1. <i>La concentration en protéines des grains, un critère qualitatif majeur</i>	13
2.2. <i>Fractions protéiques du grain de blé et caractéristiques physico-chimiques de la pâte</i>	14
2.3. <i>Effets génétiques et environnementaux sur les protéines du grain</i>	16
III Concentration en protéines et rendement : des variables intégratives interconnectées	19
3.1. <i>Natures intégratives de la concentration en protéines et du rendement</i>	19
3.2. <i>Elaboration de la concentration en protéines et du rendement au cours du cycle de développement</i>	20
3.3. <i>Interaction entre les métabolismes azotés et carbonés</i>	24
IV Absorption et assimilation de l'azote	26
4.1. <i>Absorption d'azote</i>	26
4.2. <i>Assimilation d'azote</i>	29
4.3. <i>Remobilisation de l'azote</i>	33
V Antagonisme du rendement et de la concentration en protéines	34
5.1. <i>Relation négative entre concentration en protéines et rendement</i>	34
5.2. <i>Bases physiologiques de la relation négative</i>	36
5.3. <i>Principales stratégies pour augmenter la concentration en protéines</i>	38
VI Objectifs de la thèse et stratégie de recherche.....	45
Références	47
Chapitre 3. Compléments d'information sur les matériels et méthodes	56
I Matériel végétal étudié	57
II Méthodologie de culture en conditions contrôlées.....	58
III Analyses de séquences des gènes du métabolisme azote	60
3.1. <i>Méthodologie d'analyse des séquences</i>	60
3.2. <i>Cas du gène NRT2.1</i>	60
IV Développement d'amorces génériques pour les gènes du métabolisme azoté.....	63
V Choix des gènes de référence	65

VI	Extraction des acides nucléiques	67
6.1.	<i>Le choix d'une méthode semi-automatisée</i>	67
6.2.	<i>Protocole d'extraction des ARN</i>	68
	Références	71

Chapitre 4. Post-flowering nitrate uptake in wheat is controlled by N status at flowering, with a putative major role of root nitrate transporter NRT2.1. 72

I	Abstract	72
II	Introduction	73
III	Materials and methods	76
3.1.	<i>Plant material</i>	76
3.2.	<i>Sampling protocol</i>	76
3.3.	<i>Physiological measurements and total nitrogen sample analysis</i>	77
3.4.	<i>Analysis of ¹⁵N</i>	77
3.5.	<i>Gene expression and NO₃⁻ concentration assay sample preparation</i>	77
3.6.	<i>NO₃⁻ concentration assays</i>	77
3.7.	<i>qRT-PCR experiments</i>	77
3.8.	<i>Data availability</i>	78
3.9.	<i>Statistical analyses</i>	78
3.10.	<i>Nitrogen nutrition index</i>	78
IV	Results	80
4.1.	<i>Effects of pre-flowering NO₃⁻ treatments on plant morphology, biomass and N concentration</i>	80
4.2.	<i>NO₃⁻ uptake during the post-flowering period</i>	82
4.3.	<i>Post-flowering dynamics of [NO₃⁻] and NO₃⁻ transporter gene expression in roots</i>	84
4.4.	<i>NO₃⁻ reduction and assimilation network</i>	88
V	Discussion	91
5.1.	<i>Evaluation of growing conditions</i>	91
5.2.	<i>Post-flowering control of NO₃⁻ uptake</i>	92
5.3.	<i>Relationships between plant NO₃⁻ uptake and the expression of N metabolism genes</i>	94
5.4.	<i>Hypotheses for grain N content limitation</i>	95
VI	Conclusion.....	97
VII	Acknowledgements	97
	References	98

Chapitre 5. Bread wheat grain protein concentration is related to early post-flowering nitrate uptake under putative control of plant satiety level..... 102

I	Avant-propos	102
II	Abstract	103

III	Introduction	104
IV	Material and methods	107
4.1.	<i>Plant material</i>	107
4.2.	<i>Sampling protocol</i>	108
4.3.	<i>Physiological measurements</i>	108
4.4.	<i>Preparation of root samples for NO₃⁻ concentration and gene expression analysis</i>	108
4.5.	<i>Metabolite measurements</i>	108
4.6.	<i>qRT-PCR analyses</i>	109
4.7.	<i>Statistical analyses</i>	109
V	Results	110
5.1.	<i>Plant N status at flowering</i>	110
5.2.	<i>Impact of N treatments on agronomic traits at maturity</i>	111
5.3.	<i>Relations between grain yield and grain N concentration</i>	112
5.4.	<i>Post-flowering N uptake and N remobilisation</i>	113
5.5.	<i>Relation between grain N concentration and early PANU</i>	115
5.6.	<i>Physiological and molecular determination of early PANU</i>	116
VI	Discussion	120
6.1.	<i>Growing conditions and choice of genotypes</i>	120
6.2.	<i>GPC at maturity is correlated with early PANU at GS65+250 DD</i>	121
6.3.	<i>Genetic variability for early PANU regulation</i>	122
6.4.	<i>Genetic variability for early PANU is linked to vegetative growth after flowering</i>	123
6.5.	<i>Molecular determination of early PANU</i>	123
6.6.	<i>Putative influence of satiety level on the balance between PANU and N remobilisation</i>	125
VII	Conclusion.....	126
VIII	Acknowledgements	126
	References	127

Chapitre 6. Chez le blé tendre, la concentration en azote des grains est fortement corrélée à l'absorption d'azote post-floraison précoce en conditions de culture au champ..... 131

I	Avant-propos	131
II	Résumé	132
III	Introduction	133
IV	Matériel et méthodes	135
4.1.	<i>Matériel végétal</i>	135
4.2.	<i>Modalités azotées</i>	135
4.3.	<i>Méthodologie de prélèvement et traitement des échantillons</i>	136
4.4.	<i>Indice de nutrition azotée</i>	137
4.5.	<i>PANU et remobilisation azotée</i>	137
4.6.	<i>Analyses statistiques</i>	137

V	Résultats	138
5.1.	<i>Statuts azotés à floraison</i>	138
5.2.	<i>Composantes agronomiques à maturité.....</i>	138
5.3.	<i>Absorption post-floraison et remobilisation d'azote</i>	140
5.4.	<i>Cinétique de concentration en azote des plantes</i>	141
5.5.	<i>Relation entre PANU et concentration en azote des grains.....</i>	143
VI	Discussion	145
6.1.	<i>Effets des traitements azotés</i>	145
6.2.	<i>Comparaison des conditions de cultures au champ et semi-hydroponiques</i>	145
6.3.	<i>Contrôle de l'absorption d'azote</i>	146
6.4.	<i>Corrélation entre PANU_{précoc} et concentration en azote des grains.....</i>	147
VII	Conclusion.....	149
	Références	150
Chapitre 7. Discussion générale et perspectives des travaux		152
I	Une approche génétique pour l'amélioration de la concentration en protéines	152
II	Des travaux focalisés sur un processus physiologique plutôt qu'une approche gène candidat	154
III	Un dilemme entre recherche fondamentale de déterminismes génétiques et applications au champ	155
IV	Une meilleure compréhension des mécanismes fins d'absorption d'azote.....	157
V	Des marqueurs potentiels de la concentration en protéines des grains	158
5.1.	<i>Croissance en biomasse des tiges après floraison.....</i>	158
5.2.	<i>Concentration en nitrate des racines</i>	159
5.3.	<i>Quel est le marqueur le plus pertinent ?.....</i>	160
VI	Perspectives de poursuites et de valorisation des travaux	161
6.1.	<i>Améliorer la définition du réseau de gènes « azote » et de sa régulation systémique</i>	161
6.2.	<i>Valider les marqueurs de la concentration en protéines du grain sur des panels génétiques larges</i>	162
	Références	164
Chapitre 8. Annexes		167
I	Annexe 1 : Données supplémentaires du chapitre 4	167
II	Annexe 2 : Données supplémentaires du chapitre 5	176

Liste des Figures

Chapitre 2

Figure 2-1 : Arbre phylogénétique des principales céréales cultivées..	4
Figure 2-2 : Agencement des talles chez le blé et structure d'une talle après floraison..	5
Figure 2-3 : Stades de développement du blé selon les échelles de Zadoks et de Feekes.....	6
Figure 2-4 : Structure anatomique de l'épi de blé, de l'épillet et de la fleur.....	7
Figure 2-5 : Anatomie du grain de blé..	8
Figure 2-6 : Schématisation de l'histoire évolutive des blés et du caryotype du blé tendre.....	9
Figure 2-7 : Evolution des teneurs en protéines des blés français de 1986 à 2011.	11
Figure 2-8 : Schématisation des mécanismes impliqués dans l'assimilation et la remobilisation d'azote chez les plantes.....	32
Figure 2-9 : Relation négative entre concentration en protéines et rendement.	34
Figure 2-10 : Synthèse des effets environnementaux sur la relation négative concentration en protéines – rendement..	35
Figure 2-11 : Evolution des pratiques de fertilisation azotée des blés français de 1994 à 2006.	39
Figure 2-12 : Exemples de déviations positive et négative de certains génotypes à la relation négative moyenne entre concentration en protéines et rendement conduisant à la détermination de GPD positifs (GPD+) et de GPD négatifs (GPD-).....	42
Figure 2-13 : Synthèse des nœuds de variabilité génétique potentiels associés aux principaux facteurs de régulation de l'absorption d'azote et susceptibles d'être impliqués dans le déterminisme du GPD.....	43

Chapitre 3

Figure 3-1 : Photographie du système de culture semi-hydroponique en fonctionnement.	58
Figure 3-2 : Principe de fonctionnement du système semi-hydroponique..	59
Figure 3-3 : Alignement des séquences promotrices et codantes des gènes <i>NRT2</i> putatifs du blé.....	62
Figure 3-4 : Arbre de distances génétiques des gènes <i>NRT2</i> issus de diverses espèces.....	62
Figure 3-5 : Exemple de positionnement d'une amorce « reverse » amplifiant les homéologues du gène <i>GS2</i> ..	63
Figure 3-6 : Etapes de validation des couples d'amorces.....	64
Figure 3-7 : Exemples de profils d'expression de quatre gènes de ménage testés.....	66
Figure 3-8 : Robot Quiagen Biosprint (Qiagen, Venio, Pays-Bas).	67
Figure 3-9 : Principe d'extraction d'ARN à l'aide de billes paramagnétiques.....	68
Figure 3-10 : Photographie d'ARN de bonne qualité.....	70

Chapitre 4

Figure 4-1 : Plant N concentration dynamics during the post-flowering period for the four NO_3^- treatments.....	82
Figure 4-2 : Plant NO_3^- uptake dynamic during post-flowering period for the four NO_3^- treatments per square meter (A) or per unit DW (B).....	83
Figure 4-3 : Roots NO_3^- concentration dynamics during the post-flowering period for two contrasting NO_3^- treatments (N4 and N10).....	85

Figure 4-4 : Relative expression patterns of <i>TaNRT2.1</i> (A) and <i>TaNRT1</i> (B) genes in roots from flowering (GS65) to GS65+800DD for two contrasting NO ₃ ⁻ treatments (N4 and N10).....	86
Figure 4-5 : Relations between plant NO ₃ ⁻ uptake and relative expression levels of <i>TaNRT2.1</i> (A) and <i>TaNRT1</i> (B) in roots from flowering (GS65) to GS65+800DD for two contrasting NO ₃ ⁻ treatments (N4 and N10)..	87
Figure 4-6 : Relations between roots NO ₃ ⁻ concentration and relative expression level of <i>TaNRT2.1</i> in roots for two contrasting NO ₃ ⁻ treatments (N4 and N10) from flowering (GS65) to GS65+800DD (A) and from flowering (GS65) until NO ₃ ⁻ uptake stop (respectively GS65+400DD and GS65+300DD for N4 and N10) (B).	88
Figure 4-7 : Correlations between relative expression patterns of the main genes involved in NO ₃ ⁻ uptake, reduction and assimilation in roots from flowering (GS65) to GS65+800DD for two contrasting NO ₃ ⁻ treatments (N4 and N10).....	90

Chapitre 5

Figure 5-1 : Relations between grain yield and grain N concentration at three post-flowering developmental stages.	113
Figure 5-2 : Post-flowering N uptake (A) and N remobilisation (B) for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 and N10 combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN..	114
Figure 5-3 : Relation between N uptake from flowering to GS65+250 DD and grain N concentration at maturity for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN..	116
Figure 5-4 : Relation between stem biomass increment and N uptake from flowering to GS65+250 DD for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN.....	117
Figure 5-5 : Relations between expression levels of genes coding for root nitrate transporters and N uptake from flowering to GS65+250 DD.	118
Figure 5-6 : Relations between relative expression levels of genes coding for root nitrate transporters and relative expression levels of genes involved in nitrate assimilation, or nitrate concentration in roots at GS65+250 DD..	119

Chapitre 6

Figure 6-1 : Dynamiques d'absorption d'azote (A) et de remobilisation d'azote (B) observées pour les quatre modalités azotées de l'expérimentation au cours de la phase post-floraison.	141
Figure 6-2 : Dynamiques des concentrations en azote des plantes soumises aux quatre modalités azotées de l'expérimentation au cours de la phase post-floraison..	142
Figure 6-3 : Relation entre la quantité d'azote absorbée de GS65 à GS65+250 °CJ et la concentration en azote des grains à maturité.....	143

Table des tableaux

Chapitre 2

Table 2-1 : Grille de classement qualitatif des blés français et répartition de la récolte 2014..	13
Table 2-2 : Part de variance de la concentration en protéines des grains imputée à la variété, à l'environnement et à l'interaction variété x environnement dans plusieurs dispositifs d'essais sous deux stratégies phytosanitaires traité (T) et non-traité (NT).	17

Chapitre 4

Table 4-1 : Tiller number, plant dry weight, plant N concentration, total plant N and NNI at flowering for the four NO ₃ - treatments..	80
Table 4-2 : Plant dry weight, plant N concentration, grain yield, grain N concentration and harvest index at maturity for the four NO ₃ - treatments.....	81

Chapitre 5

Table 5-1 : Spike number, green laminae area, plant dry weight, plant N concentration, total plant N and Nitrogen Nutrition Index (NNI) at flowering for the two genotypes at two contrasting pre-flowering N treatments..	111
Table 5-2 : Grain yield, grain N concentration, total grain N and N harvest index at maturity for the two genotypes studied under four N treatments.....	112

Chapitre 6

Table 6-1 : Détail des apports d'azote réalisés pour les quatre modalités azotées de l'étude.	136
Table 6-2 : Nombre d'épis par mètre carré, surface foliaire, biomasse totale, concentration en azote des parties aériennes, quantité d'azote totale et indice de nutrition azoté (INN) à floraison pour les deux traitements pré-floraison contrastés N- et N+.....	138
Table 6-3 : Rendement grains, concentration en azote des grains, quantité d'azote des grains, absorption d'azote post-floraison et quantité d'azote remobilisée à maturité pour les quatre modalités azotées de l'expérimentation..	139

Chapitre 1. Introduction générale

La concentration en protéines des grains est un critère qualitatif majeur du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) du fait de son influence marquée sur les caractéristiques rhéologiques de la farine. Cependant, la forte relation négative existant entre la concentration en protéines et le rendement quand des variétés sont comparées dans les mêmes conditions (Simmonds, 1995; Feil, 1997; Monaghan et al., 2001; Triboi et al., 2006; Oury and Godin, 2007) pose de sérieux problèmes en amélioration variétale. Cette relation implique qu'en moyenne, l'augmentation du rendement est accompagnée d'une diminution de la concentration en protéines. Ce phénomène a largement été observé au cours du 20^{ème} siècle, où les fortes augmentations de rendement permises par la « révolution verte » ont été associées à une diminution conséquente de la concentration en protéines des grains (Le Buanec, 1999; Oury et al., 2003; Triboi et al., 2006; Jeuffroy and Oury, 2012; Amiri et al., 2015). En 2014, la concentration en protéines moyenne des blés français a atteint la valeur de 11,1 % (FranceAgriMer, 2014), très proche du seuil qualitatif de 11 % fixé par les industriels de la farine et les marchés d'exportation. Le poids des exportations de matières premières agricoles dans la balance commerciale française confère un enjeu fort à l'augmentation des concentrations en protéines des grains, sans toutefois que ces améliorations ne pénalisent le rendement.

A l'heure actuelle, l'approche classiquement mise en œuvre au champ pour atteindre à la fois un rendement élevé et une concentration en protéines compatible avec les exigences industrielles repose sur le levier agronomique des apports d'azote et de leur fractionnement. Cependant, la valorisation de l'apport d'azote tardif visant l'augmentation de la concentration en protéines est très dépendante des conditions pédoclimatiques. Ce type d'approche est ainsi de plus en plus discutable dans le contexte actuel qui incite à la limitation des intrants de synthèse du fait leur prix élevés et de l'impact négatif de leur usage intensif sur les écosystèmes naturels (Rothstein, 2007). Dans ce sens, l'alternative d'une augmentation de la concentration en protéines par une intensification des programmes de fertilisation doit être bien réfléchie.

Le levier génétique se présente de ce fait comme une cible privilégiée d'amélioration de la concentration en protéines. Parmi les approches mises en œuvre pour améliorer le potentiel génétique des variétés à accumuler des protéines du grain, une alternative intéressante permettant d'augmenter ce trait sans pénaliser le rendement a été proposée par Monaghan *et al.* (2001). Ces auteurs ont suggéré d'utiliser la déviation robuste de certains génotypes à la relation négative moyenne entre concentration en protéines et rendement (appelée Grain Protein Deviation ; GPD) comme marqueur de sélection pour l'amélioration de la concentration en protéines. Cette approche prometteuse présente cependant des inconvénients, car le GPD est un caractère complexe à quantifier. Sa mesure nécessite l'expérimentation d'un panel génétique relativement large en cinq lieux et deux années d'études pour atteindre une estimation correcte (Oury and Godin, 2007). De ce fait, bien qu'il ait été intégré à l'évaluation des variétés en cours d'inscription au catalogue officiel français en 2007, le GPD est actuellement trop complexe à évaluer dans les générations précoces de sélection. La

détermination de marqueurs physiologiques ou moléculaires plus simples à mesurer et robustement associés au GPD se positionne ainsi comme une condition *sine qua non* à la généralisation d'une sélection sur ce caractère.

En 2010, Bogard *et al.* ont établi les bases physiologiques du GPD en s'appuyant sur des expérimentations multi-locales. Ces auteurs ont montré que ce trait était fortement corrélé à la capacité des génotypes à absorber de l'azote après floraison indépendamment de la quantité d'azote déjà absorbée à floraison, suggérant ainsi que le GPD soit lié à un déterminisme génétique de satiété pour l'azote. Ces travaux présentent une base prometteuse pour l'étude des déterminismes du GPD à une échelle plus fine, qui permettrait de cibler précisément les nœuds de variabilité génétique associés à ce caractère. Ce type d'étude repose nécessairement sur une analyse poussée des mécanismes de régulation de l'absorption d'azote post-floraison en fonction du statut azoté des plantes.

Les avancées remarquables des connaissances relatives aux mécanismes moléculaires impliqués dans l'absorption d'azote chez les espèces modèles, notamment *Arabidopsis thaliana*, ouvrent des perspectives de valorisation prometteuses chez des espèces d'intérêt agronomique comme le blé. Bien que l'intégralité des gènes impliqués dans l'absorption d'azote du blé ne soient pas encore connus, des homologues des gènes centraux du métabolisme azoté décrits chez *A. thaliana* ont été caractérisés. La disponibilité de tels outils offre la possibilité de combiner les approches physiologiques et moléculaires dans la recherche de nœuds de variabilité génétique associés au GPD.

Ce travail a été conduit dans le cadre d'une thèse CIFRE cofinancée par l'ANRT et Arvalis-Institut du Végétal. Il a profité de financement d'un projet du Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale (FSOV) qui abordait de façon plus large la variabilité environnementale et génétique du GPD.

Les objectifs des travaux réalisés au cours de cette thèse étaient de caractériser plus finement les déterminismes du GPD en combinant des approches physiologiques et moléculaires, dans l'optique de proposer des marqueurs potentiellement valorisables à moyen terme en amélioration variétale. A une échelle fondamentale, ces travaux se sont attachés à offrir une meilleure compréhension des mécanismes fins de régulation de l'absorption post-floraison en fonction du statut azoté des plantes. A une échelle plus appliquée, la comparaison de deux génotypes contrastés pour leur GPD a permis de déterminer des nœuds de variabilité génétique associés à ce trait, qui représentent des marqueurs potentiels.

Ce manuscrit de thèse débute classiquement par une synthèse bibliographique. Après une brève présentation des éléments botaniques, phylogéniques, évolutifs et contextuels de la culture de blé, la concentration en protéines, critère qualitatif majeur, sera ensuite présentée en détails, notamment au travers de son importance économique et technologique. Nous discuterons ensuite des interconnexions entre les métabolismes azoté et carboné à l'échelle de la plante, posant les bases de l'antagonisme entre le rendement et la concentration en protéines qui est au cœur du sujet de cette thèse. Les objectifs et la stratégie de recherche mise en œuvre au cours de ces travaux seront décrits en préambule des trois chapitres de résultats rédigés sous forme d'articles. Les éléments clés de ces chapitres de résultats seront ensuite mis

en perspective dans une discussion générale, en insistant sur les perspectives ouvertes par ce travail à un niveau fondamental ou en utilisation plus directe en amélioration variétale.

Références

- Amiri R, Bahraminejad S, Sasani S, Jalali-Honarmand S, Fakhri R.** 2015. Bread wheat genetic variation for grain's protein, iron and zinc concentrations as uptake by their genetic ability. *European Journal of Agronomy* **67**, 20–26.
- Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J-M, Jeuffroy M-H, Gate P, Martre P, Le Gouis J.** 2010. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4303–4312.
- Feil B.** 1997. The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends in Agronomy* **1**, 103–119.
- FranceAgriMer.** 2014. Qualité des blés français à l'entrée des silos de collecte. <http://www.franceagrimer.fr/>
- Jeuffroy MH, Oury FX.** 2012. Impact des nouvelles techniques de production, impliquant de faibles niveaux d'intrants, sur la quantité de protéines du blé. *Innovations Agronomiques* **19**, 13–25.
- Le Buanec B.** 1999. Diversité génétique des variétés de blé tendre cultivées en France au cours du vingtième siècle. Evolution variétale, données techniques et économiques. *Comptes rendus de l'académie d'agriculture française* **85**, 37-53.
- Monaghan JM, Snape JW, Chojecki AJS, Kettlewell PS.** 2001. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica* **122**, 309–317.
- Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Pluchard P, Rousset M, Galic N.** 2003. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program [*Triticum aestivum* L.]. *Journal of Genetics and Breeding* **57**.
- Oury FX, Godin C.** 2007. Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica* **157**, 45–57.
- Rothstein SJ.** 2007. Returning to our roots: making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *Plant Cell* **19**, 2695–2699.
- Simmonds NW.** 1995. The relation between yield and protein in cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **67**, 309–315.
- Triboi E, Martre P, Girousse C, Ravel C, Triboi-Blondel A-M.** 2006. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 108–118.

I Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

1.1. Eléments phylogéniques

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est une céréale appartenant à la tribu des Triticées au sein de la famille des Poacées, qui fait partie à une échelle plus large des angiospermes monocotylédones. La famille des Poacées regroupe près de 12 000 espèces. Elle revêt un intérêt économique majeur, car une grande partie des ressources alimentaires humaines repose sur des espèces qui la composent, notamment d'autres céréales comme le maïs (*Zea*), le riz (*Oriza*) ou le sorgho (*Sorghum*), mais également des graminées fourragères comme le dactyle (*Dactylis*), la fétuque (*Festuca*) ou le ray-grass (*Lolium*) utilisées en alimentation du bétail. La tribu des Triticées regroupe des espèces relativement proches du blé telles que l'orge (*Hordeum*) et le seigle (*Secale*). La dénomination de céréale est attribuée à des plantes cultivées pour leurs grains utilisés en alimentation humaine ou animale appartenant toutes à la famille des Poacées (Figure 2-1 p.4).

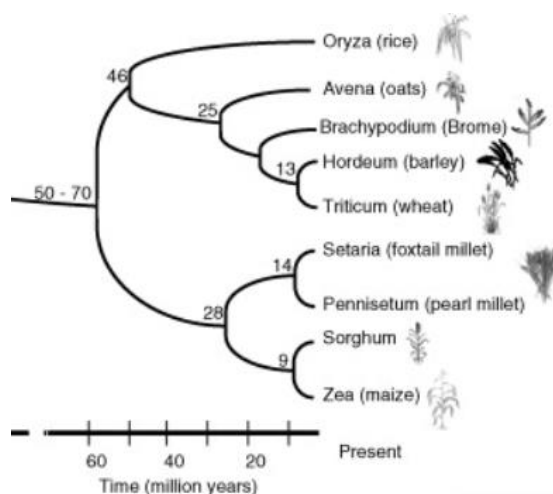


Figure 2-1 : Arbre phylogénétique des principales céréales cultivées. Les dates estimées de divergence entre espèces sont exprimées en millions d'années. (Bolot *et al.*, 2009).

1.2. Eléments botaniques

1.2.1. La plante de blé

Le blé est une plante herbacée annuelle à croissance définie. Elle est constituée d'un ensemble de brins appelés talles (Figure 2-2A p.5). Chaque talle est une entité comportant une

tige feuillée, qui constitue la partie végétative, un épi qui est la partie reproductrice ainsi qu'un système racinaire (Figure 2-2B p.5). La première talle émise, issue du bourgeon apical, est appelée maître brin tandis que les suivantes issues de bourgeons axillaires sont appelées talles secondaires. Les talles secondaires, ramifications du maître brin, sont émises depuis des bourgeons situés à la base de la plante au niveau du plateau de tallage. L'émission des talles secondaires intervient selon un ordre chronologique au cours du développement de la plante. Ainsi, un numéro correspondant à leur ordre d'apparition est souvent attribué aux différentes talles secondaires afin de les caractériser.

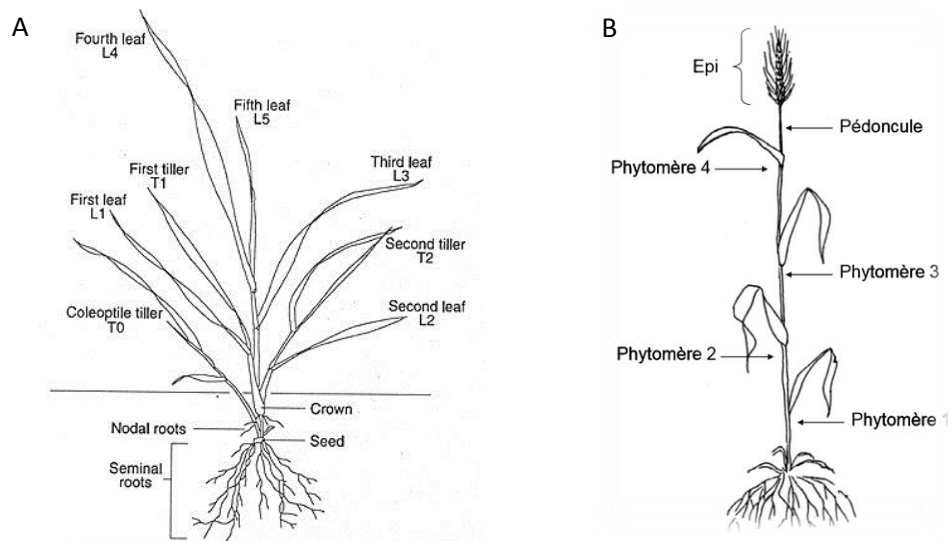


Figure 2-2 : Agencement des talles chez le blé et structure d'une talle après floraison. La talle primaire ou maître brin est issue du bourgeon apical, tandis que les talles secondaires sont issues de bourgeons axillaires situés au niveau du plateau de tallage. La talle issue du bourgeon du coléoptile n'est pas une talle secondaire au sens strict, et demeure généralement plus chétive (A). Une talle est constituée d'un appareil racinaire, d'un ensemble d'unités morphologiques appelées phytomères, d'un pédoncule et d'un épi. Chaque phytomère comprend un nœud, un entre-nœud, une gaine foliaire ainsi qu'un limbe foliaire (B) (Bertheloot, 2009).

1.2.2. Cycle de développement du blé

Le cycle de développement du blé est divisé en deux grandes phases. La première est une phase végétative, qui correspond à une production de feuilles, de tiges et de racines tandis que la seconde est reproductive, avec l'apparition d'un épi portant des fleurs et la formation de grains. L'établissement d'échelles de notation des stades phénologiques a permis de normaliser l'évaluation des stades clés de développement du blé (Figure 2-3 p.6). L'initiation de la transition entre la phase végétative et la phase reproductive marque la différence majeure existant entre deux classes de blé : les blés d'hiver et les blés de printemps. Dans le

cas des blés d'hiver, la transition florale est initiée sous l'effet de conditions environnementales hivernales. De ce fait, pour initier la formation de son appareil reproducteur, la plante nécessite une période de froid et de jours courts appelée vernalisation. Ce type de blé est semé en automne pour fleurir au printemps. Chez les blés de printemps, ce besoin en froid n'existe pas, et la transition florale est induite lorsqu'un nombre de feuilles déterminé a été mis en place, éventuellement modulé par de la sensibilité à la photopériode. Ces blés sont semés au printemps et fleuriront l'année du semis.

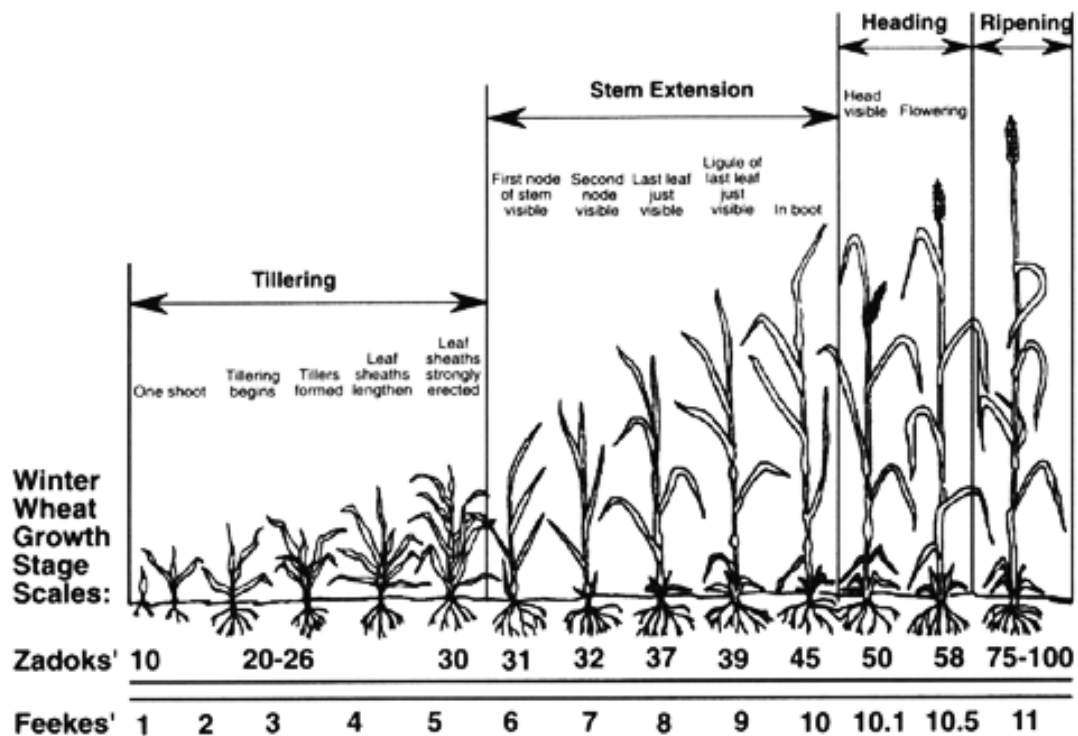


Figure 2-3 : Stades de développement du blé selon les échelles de Zadoks et de Feekes (Alley *et al.*, 1999).

1.2.3. L'épi de blé

L'épi de blé est dit composé, ce qui signifie que ses différentes sous-entités sont elles-mêmes de petits épis appelés épillets. Les épillets sont disposés sur deux rangées opposées par rapport à l'axe central appelé rachis, en position alterne (Figure 2-4 p.7). Chaque épillet peut contenir entre deux et neuf fleurs hermaphrodites, mais en contient plus généralement de trois à cinq. Les fleurs supérieures peuvent être stériles. L'épillet est pourvu à sa base de deux glumes égales. La fleur de blé, dépourvue de pétales, est entourée de deux glumelles. La glumelle extérieure appelée *lemma* est coriace et peut présenter ou non de une à trois arrêtes qui sont communément appelées barbes. La glumelle intérieure, ou *palea* est membraneuse et dépourvue d'arêtes. La fleur est composée d'un ovaire surmonté de deux styles plumeux,

ainsi que de trois étamines. Elle est dite cléistogame, ce qui signifie que le pollen mature est relâché avant l'ouverture de la fleur. Ce caractère floral du blé conditionne son mode de reproduction qui est à forte dominance autogame, c'est-à-dire basé sur l'autofécondation.

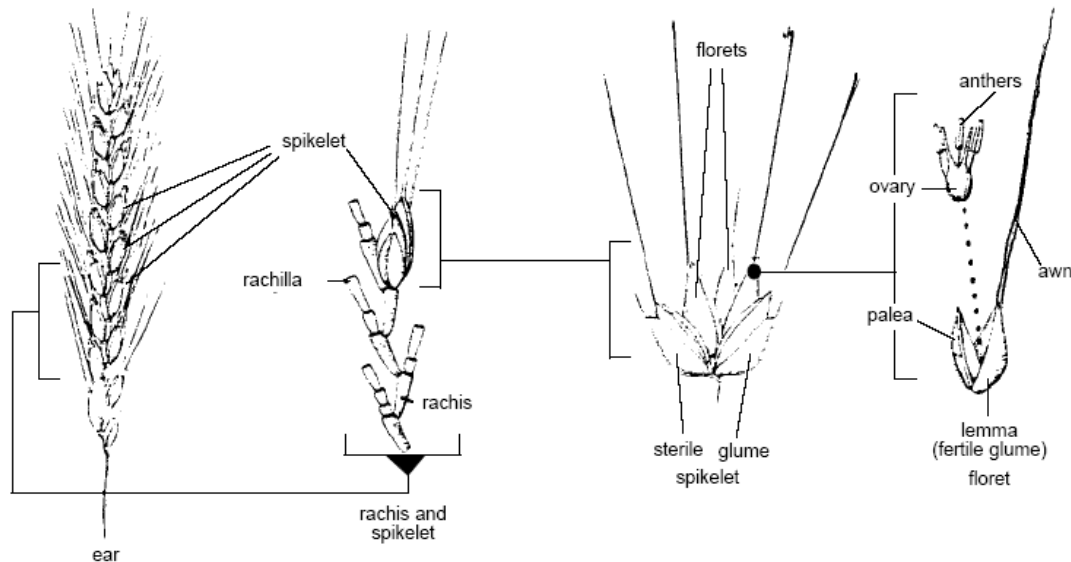


Figure 2-4 : Structure anatomique de l'épi de blé, de l'épillet et de la fleur. Un épi de blé est composé de deux rangées d'épillets disposés de manière alterne de part et d'autre du rachis. Chaque épillet comporte à sa base deux glumes, et supporte généralement de trois à cinq fleurs. La fleur de blé est dépourvue de pétales et est composée d'un ovaire surmonté de deux styles plumeux, ainsi que de trois étamines. Elle est protégée par deux glumelles appelées *lemma* et *palea* (Setter and Carlton, 2000).

1.2.4. Le grain de blé

Le grain de blé (caryopse) est un fruit sec indéhiscent dont la graine (amande) est soudée à l'enveloppe (péricarpe) par son tégument. Il est principalement composé d'une enveloppe (péricarpe), d'un embryon, ainsi que de tissus nourriciers regroupés sous la dénomination d'albumen comprenant l'albumen amylicé et la couche à aleurone (Figure 2-5 p.8). Sur sa phase dorsale, le grain porte une brosse à l'extrémité opposée à l'embryon, et comporte un sillon en phase ventrale. Le grain est principalement composé d'amidon (environ 65%), de protéines (entre 10% et 15%), d'eau (environ 15%), ainsi que de lipides, pentosanes, cellulose et divers micro éléments. L'albumen contient la totalité de l'amidon du grain ainsi que près de 90% de ses protéines. Il représente de 80 à 85% de la masse totale du grain. La composition et la structure de l'amidon et des protéines du grain ont une influence forte sur les usages industriels du blé, car elles conditionnent les propriétés physico-chimiques de la pâte obtenue après un ajout d'eau à la farine.

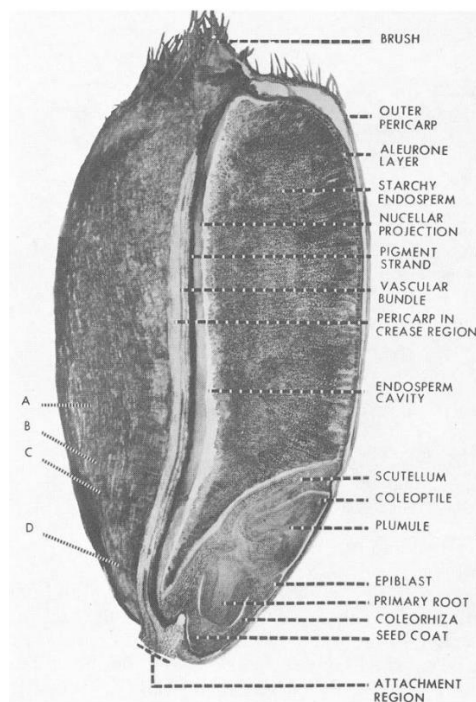


Figure 2-5 : Anatomie du grain de blé. Le grain de blé est composé d'une enveloppe (péricarpe), de tissu nourriciers appelés albumen (regroupant albumen amylicé et couche à aleurone) et d'un embryon (Lersten, 1987).

1.3. Histoire évolutive du blé

Les blés au sens large, appartenant tous au genre *Triticum*, ont connu une histoire évolutive remarquable marquée par plusieurs événements d'allopoloïdisation qui ont conduit à des espèces modernes aux niveaux de ploïdie variés. Parmi elles, on retrouve des espèces diploïdes telles que l'engrain (*Triticum monococcum*), des tétraploïdes comme le blé dur (*Triticum durum*) ou le blé amidonnier (*Triticum dicoccum*) et des hexaploïdes comme le blé tendre (*Triticum aestivum*) ou l'épeautre (*Triticum spelta*). Toutes ces espèces cultivées ont une histoire évolutive commune, et partagent une grande partie de leur génome. Trois espèces ancêtres diploïdes sont à l'origine des blés actuels. Il s'agit de *Triticum urartu* (portant le génome A; $2n=14$), *Aegilops speltoides* (portant le génome B; $2n=14$) et *Triticum tauschii* (portant le génome D; $2n=14$). Ces ancêtres des blés sont génétiquement proches, *T. urartu* et *Ae. Speltoïdes* étant issus d'une spéciation datant de 6,5 millions d'années depuis un ancêtre commun, et *T. tauschii* dérivant d'une hybridation de *T. urartu* et *Ae. Speltoïdes* estimée à 5,5 millions d'années (Marcussen *et al.*, 2014).

Il y a environ 0,8 millions d'années, bien avant la domestication du blé, une hybridation a eu lieu entre *T. urartu* (AA) et *Ae. Speltoïdes* (BB) pour donner une espèce tétraploïde (AABB) de laquelle dérivent le blé dur et le blé amidonnier. Bien plus tard, il y a moins d'un demi-million d'années selon les données de séquences (Marcussen *et al.*, 2014), et de ce fait

probablement beaucoup plus tôt que les ~10 000 ans souvent cités sur la base des données archéologiques, une seconde hybridation a eu lieu entre un blé tétraploïde (AABB) et *T. tauschii* (DD) aboutissant à l'ancêtre hexaploïde (AABBDD) du blé tendre et de l'épeautre (Figure 2-6A p.9). Le blé tendre actuel, constitué des trois sous-génomes ancestraux diploïdes, possède ainsi 42 chromosomes et détient trois copies de chaque groupe chromosomique des ancêtres appelés groupes homéologues (Figure 2-6B p.9).

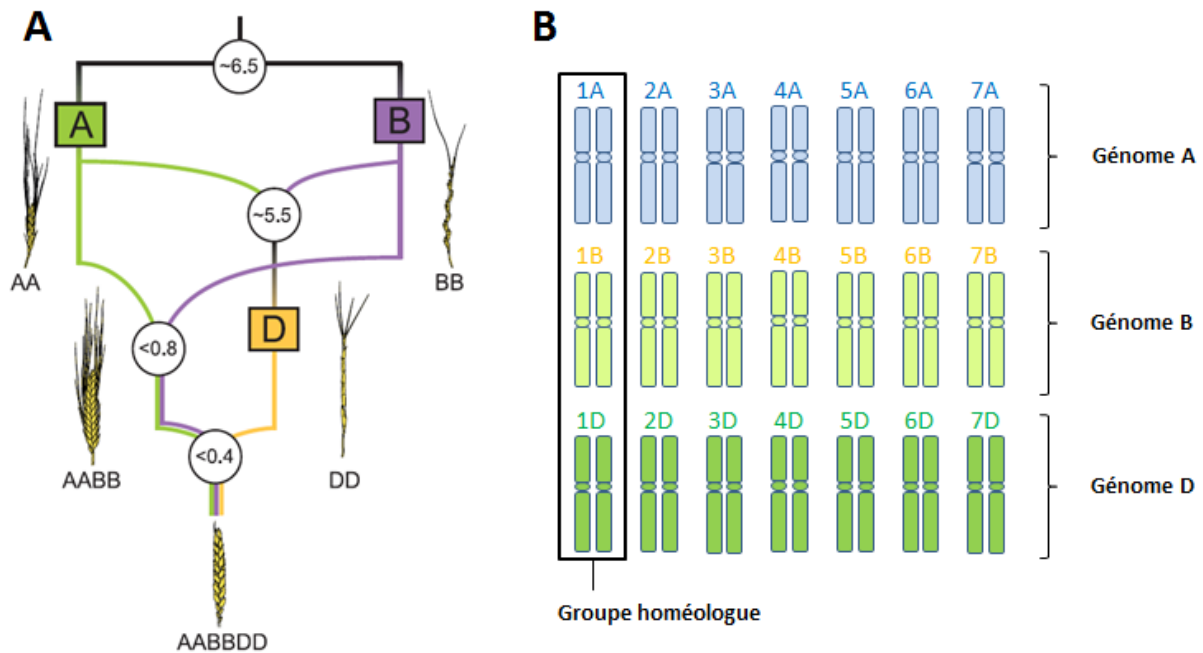


Figure 2-6 : Schématisation de l'histoire évolutive des blés et du caryotype du blé tendre. Les blés appartenant au genre *Triticum* sont issus de trois ancêtres diploïdes *Triticum urartu* (portant le génome A; $2n=14$), *Aegilops spelta* (portant le génome B; $2n=14$) et *Triticum tauschii* (portant le génome D; $2n=14$). Le blé dur et le blé amidonnier sont des espèces tétraploïdes (AABB ; $2n=28$) descendant du croisement spontané entre *T. urartu* et *Ae. spelta*. Le blé tendre et l'épeautre sont des espèces hexaploïdes (AABBDD ; $2n=42$) dérivant du croisement entre un blé tétraploïde et *T. tauschii*. Les dates estimées des événements de spéciations et d'hybridations sont exprimées en millions d'années (A) (Marcussen *et al.*, 2014). Le blé tendre hexaploïde possède 42 chromosomes. Il est composé des trois sous-génomes diploïdes ancestraux A, B et D. Chaque groupe chromosomique est appelé groupe homéologue (B).

Les événements de polyploïdisation qui ont marqué l'évolution des espèces du genre *Triticum* ont probablement influencé leur domestication (Dubcovsky and Dvorak, 2007). Ces espèces sont en effet très largement représentées dans l'agriculture actuelle. Cependant, ces événements ont conduit à des génomes de très grandes tailles, complexifiés par la redondance en gènes portés par les différents sous-génomes, et la présence de séquences répétées

représentant 85% du génome. A chaque *locus*, le blé possède théoriquement 3 copies de gènes homéologues portées par chacun des trois sous-génomes. La taille du génome du blé est estimé à 17 gigabases (Gb), soit cinq à six fois la taille du génome humain, et il n'est à ce jour pas totalement séquencé. Un consortium international (IWGSC) a été formé en 2005 afin de coordonner les efforts de séquençage du génome du blé à l'échelle mondiale. Dans ce cadre, une équipe française a récemment abouti au séquençage complet du chromosome 3B, qui est le plus grand chromosome du blé (Choulet *et al.*, 2014).

1.4. Eléments contextuels

1.4.1. Production, consommation et échanges de blé

Depuis l'aube de l'agriculture, le blé est à la base de l'alimentation de la civilisation indo-européenne. Son adaptabilité à une large gamme de latitudes est rendue possible par la grande diversité génétique existante au sein de cette espèce qui comprend plus de 25 000 écotypes (Shewry, 2009). A l'échelle mondiale, le blé est la céréale la plus cultivée en termes de surfaces semées avec près de 220 millions d'hectares, et la troisième en termes de production de grains, après le maïs et le riz, avec 713 millions de tonnes produites en 2013 (FAOSTAT). Cinq pays ou groupes de pays producteurs assurent plus de 60% de la production mondiale de blé. La Chine et l'Inde représentent à eux seuls 30% de la production mondiale, suivis par l'Union Européenne à 28 états membres qui compte pour 20%, les Etats-Unis d'Amérique pour 8%, et la Russie pour 7% (FAOSTAT). A l'échelle mondiale, les rendements du blé sont en constante augmentation depuis plus de cinquante ans, suite à la révolution verte. Ces années ont été marquées par d'importantes innovations en termes de mécanisation, d'amélioration des pratiques agricoles, d'utilisation d'intrants ainsi que d'avancées considérables liées à la sélection variétale. Les niveaux de rendement moyens avoisinent actuellement les 3 tonnes par hectare (USDA, 2015), mais sont cependant très contrastés en fonction des pays. En Europe, les rendements atteignent 5.6 tonnes par hectare (FAOSTAT), bien supérieurs à la moyenne mondiale, mais ont tendance à stagner depuis une dizaine d'années (Brisson *et al.*, 2010). Ce plafonnement des rendements est principalement expliqué par l'occurrence d'événements climatiques défavorables au cours du cycle (sécheresse durant la phase de montaison et températures élevées lors du remplissage du grain principalement), couplés à la raréfaction des cultures légumineuses dans les rotations ainsi qu'à la diminution de la dose d'azote apportée d'environ 20 Kg par hectare (Brisson *et al.*, 2010).

Le volume de production réalisé en 2013 a permis de satisfaire la demande mondiale estimée à 687 millions de tonnes cette même année, ainsi que d'augmenter les stocks mondiaux (175 Mt) (FAO, 2015) qui avaient atteint un record historiquement bas en 2006 (USDA, 2015). Cependant, la demande en produits céréaliers est en constante augmentation, en lien avec l'expansion démographique, la modification des comportements alimentaires et le développement des bioénergies. A l'horizon 2050, il est estimé que la demande mondiale en céréales aura doublé (Tilman *et al.*, 2002, 2011; Godfray *et al.*, 2010). Les surfaces labourables cultivées en céréales étant proches de leur maximum à l'échelle planétaire,

l'augmentation des rendements dans un futur proche s'avère nécessaire pour satisfaire la demande.

Les échanges mondiaux de blé sont également en hausse constante depuis 50 ans (FranceAgriMer, 2011). En mars 2014, le blé rendu Rouen se négociait à 202 €/t¹ (Agreste, 2014). L'Afrique, l'Extrême Orient et le Proche Orient où l'expansion démographique est marquée sont les principales régions importatrices de blé et farines (AGPB, 2014). Au sein de l'Union Européenne, second exportateur mondial de blé (30,4 Mt) après les Etats-Unis (31,1 Mt), la France est le plus important pays exportateur avec 18,2 Mt vendues sur le marché international en 2013 (AGPB, 2014). Les exigences des clients étrangers sont de plus en plus fortes en termes de qualité du blé, dont le principal critère est la concentration en protéines des grains qui doit être comprise entre 11 et 12.5% pour être éligible à l'export. En France, la concentration en protéines de 11,1% atteinte en moyenne sur la campagne 2014 (France AgriMer, 2014a) est tout juste satisfaisante, mais se révèle handicapante pour l'accès aux marchés les plus exigeants. De tels niveaux de concentrations en protéines sont récurrents chez les blés français depuis une dizaine d'années, suite à une diminution intervenue entre les années 1980 et 2000 (Jeuffroy et Oury, 2012) (Figure 2-7 p.11). L'importance des exportations de produits agricoles dans la balance commerciale française confère un enjeu particulier à l'augmentation de la concentration en protéines du blé. La capacité à augmenter la concentration en protéines des grains conditionnera probablement le maintien des positions des blés français sur les marchés internationaux.

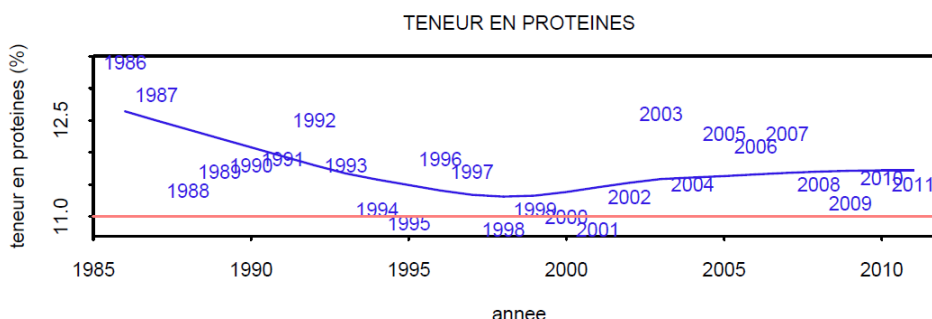


Figure 2-7 : Evolution des teneurs en protéines des blés français de 1986 à 2011. La ligne horizontale à 11% de concentration en protéines correspond au seuil en dessous duquel apparaissent des problèmes pour les débouchés industriels et les exportations (Jeuffroy et Oury, 2012).

1.4.2. Fertilisation azotée et culture du blé

Les engrais azotés de synthèse ont largement contribué à l'augmentation des rendements du blé au cours des dernières décennies, et par ce biais à l'augmentation de la production (Hawkesford *et al.*, 2013). Outre son effet sur le rendement, la fertilisation azotée revêt un intérêt majeur au travers de son impact sur la concentration en protéines des grains (Makowski *et al.*, 1999), principal critère qualitatif de la récolte. En ce sens, la fertilisation

azotée du blé, sans laquelle les niveaux de production et la concentration en protéines des grains s'effondreraient, occupe une place fondamentale dans l'agriculture moderne. Cependant, le rendement n'est pas proportionnel à la quantité d'engrais azotés utilisés. En 40 ans, alors que les rendements ont été multipliés par deux et demi à l'échelle mondiale, l'utilisation d'engrais azotés a été multipliée par sept (FAOSTAT). Ce constat met en évidence la problématique de valorisation de l'azote apporté. En Europe de l'Ouest, l'application de 250 à 300 kg d'azote par hectare est une pratique courante sur blé afin d'atteindre une concentration en protéines avoisinant les 13%. Cependant, même si les rendements peuvent atteindre les 10 tonnes par hectare, les grains produits ne contiennent qu'environ 230 kg d'azote, ce qui correspond à une part d'azote non valorisée estimée entre 50 et 70 kg (Shewry, 2009). D'un point de vue économique, cette part d'azote non valorisée pèse sur les marges brutes des exploitations céréalières, car l'azote est un produit onéreux. Les cours des engrais azotés sont fortement liés aux cours des énergies fossiles, notamment à celui du gaz naturel. Ainsi, la volatilité des cours des matières premières énergétiques se répercute largement sur le prix des engrais azotés, qui ont atteint ces dernières années le niveau record de 1 500 euros la tonne (INSEE, 2015).

La valorisation incomplète de l'azote apporté aux cultures confronte également à des problèmes environnementaux conséquents. L'azote est considéré comme un élément mobile, du fait de sa forte solubilité dans l'eau notamment sous forme de nitrates (NO_3^-). Les nitrates migrent ainsi facilement avec les flux d'eau, que ce soit par ruissellement de surface ou par infiltration vers les nappes phréatiques (Almasri and Kaluarachchi, 2004). Des apports excédentaires représentent ainsi non seulement une perte pour l'agriculteur, mais génèrent également des problèmes environnementaux tels que l'eutrophisation des cours d'eau, lourde de conséquences pour les écosystèmes aquatiques (Tilman, 1999; Smith and Schindler, 2009). L'azote utilisé en agriculture peut également prendre des formes volatiles par le biais de processus de dénitrification exercé par des bactéries du sol, telles que le protoxyde d'azote (N_2O) (Smith and Zimmerman, 1981; Robertson and Groffman, 2007), qui est un gaz à effet de serre majeur dont le pouvoir radiatif est 310 fois supérieur au dioxyde de carbone (Forster *et al.*, 2007). L'agriculture est à l'origine de près de 20% des émissions totales de gaz à effet de serre en France, et de 85% des émissions totales de N_2O , qui s'élèveraient à 740 g de N_2O émis par hectare de culture céréalière et par an (Goglio *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, le défi imposé à la communauté scientifique est de fournir aux agriculteurs les moyens de produire plus, de meilleure qualité, tout en réduisant la pression environnementale des intrants d'origine azotée. De telles ambitions impliquent nécessairement de faire évoluer parallèlement tous les secteurs d'amélioration potentiels. Parmi ceux-ci, l'amélioration variétale vis-à-vis de la valorisation de l'azote est primordiale. Cette dernière peut être approchée selon deux aspects : le premier consistant à produire plus sans augmenter les apports d'azote, et le second à maintenir les niveaux de production avec une quantité d'azote réduite. Dans les deux cas, ces modifications de valorisation de l'azote apporté devront être accompagnées d'améliorations qualitatives de la récolte en termes de concentration en protéines des grains.

II Qu'est-ce que la qualité du blé ?

2.1. La concentration en protéines des grains, un critère qualitatif majeur

En France, près de 65% de la production de blé est destinée à l'alimentation humaine (FranceAgriMer, 2014). Hormis pour quelques débouchés spécifiques tels que la biscuiterie, la concentration en protéines ainsi que la composition protéique des grains sont des éléments déterminants de leur qualité en usages industriels, notamment pour les débouchés de panification. Pour exemple, l'industrie du pain français pré-fermenté surgelé dont les ventes ont pris une forte ampleur ces dernières années utilise exclusivement du blé dont la concentration en protéines est supérieure à 15%. Les clients internationaux importent principalement des blés destinés à la consommation humaine, et ont de ce fait également des exigences en termes de protéines. Afin de normaliser la classification des blés sur les marchés nationaux et internationaux, une grille de classement des lots de blé basée sur leur valeur technologique a été mise en place depuis 1999 par l'ONIC (Table 2-1 p.13).

Table 2-1 : Grille de classement qualitatif des blés français et répartition de la récolte 2014. Les blés sont classés en quatre catégories E, 1, 2 et 3 en fonction de leur concentration en protéines, de leur force boulangère, ainsi que de leur valeur de Hagberg. En 2014 en France, 45% de la récolte présentait des teneurs en protéines inférieures à 10,5% (FranceAgriMer, 2014).

Classes	Protéines	(w) Force boulangère	Hagberg	Répartition 2014
E	≥ 12 %	≥ 250	≥ 220	2 %
1	11 - 12,5 %	160 - 250	≥ 220	20 %
2	10,5 - 11,5 %	selon contrat	≥ 180	33 %
3	< 10,5 %	non spécifié	non spécifié	45 %

Protéines : (N x 5,7) % M.S.
W : 10⁴ joules/g
Hagberg : secondes

Les lots de grains récoltés sont ainsi classés selon quatre catégories : E (exceptionnelle), 1, 2 et 3 qui influencent leur valeur marchande. Parmi les trois critères pris en compte dans cette classification, deux sont directement liés aux protéines du grain. Il s'agit de la concentration en protéines totale et de la force boulangère de la farine (W), qui est relative à la composition du grain en différentes fractions protéiques. La concentration en protéines totale est relativement simple à quantifier depuis le développement d'outils de mesure basés sur la spectrométrie dans le proche infra-rouge (Delwiche, 1998). Elle est calculée à partir de la mesure de teneur en azote total du grain multipliée par un coefficient de conversion de 5,7 (Sosulski and Imafidon, 1990). La force boulangère, critère plus complexe, représente le rapport entre la ténacité et l'extensibilité de la pâte obtenue par ajout d'eau à la farine. Elle est

mesurée à l'aide de l'alvéographe de Chopin par insufflation d'air dans un pâton afin de mesurer sa ténacité (pression d'air nécessaire pour former la bulle) ainsi que son extensibilité (volume d'air maximal de la bulle avant éclatement). Le rapport ténacité – extensibilité conditionne largement l'aspect du pain, notamment au travers de son volume après cuisson ainsi que la taille et l'organisation des bulles d'air de la mie. Le troisième critère de classification, appelé Hagberg, concerne quant à lui la qualité de l'amidon, ou plus précisément son état de dégradation sous l'effet d'enzymes liées au processus de germination des grains. En 2014, 45% de la récolte française était en classe 3, du fait de teneurs en protéines inférieures au seuil de 10,5%.

2.2. Fractions protéiques du grain de blé et caractéristiques physico-chimiques de la pâte

Les protéines contenues dans le grain de blé appartiennent à différentes familles protéiques qui n'ont pas toutes le même impact sur les caractéristiques rhéologiques de la pâte. En 1907, Osborne a différencié deux grandes classes de protéines du grain selon leur solubilité dans l'eau ou dans des solutions salines. La première famille de protéines, les prolamines, sont insolubles dans l'eau ou les solutions salines. Les prolamines constituent les protéines de réserve du grain, et représentent de 60 à 80% de ses protéines totales. La seconde famille, les protéines non-prolamines, sont solubles. Elles constituent les protéines métaboliques du grain et représentent de 15 à 20% de ses protéines totales.

2.2.1. Les prolamines

Les prolamines sont les composants principaux du gluten, qui joue un rôle essentiel dans les caractéristiques rhéologiques de la pâte issue de farine de blé. Le gluten confère à la pâte des propriétés uniques d'absorption d'eau, de cohésion, de viscosité et d'élasticité. Au sein des prolamines, deux fractions protéiques peuvent être distinguées selon qu'elles soient composées de monomères (les gliadines) ou de polymères (les gluténines). Les gliadines et les gluténines sont les deux fractions protéiques qui ont le plus d'influence sur la qualité de la pâte. La teneur en gliadines influence sa viscosité et lui confère de l'extensibilité (Barak *et al.*, 2013), tandis que la teneur en gluténines, ou plus précisément la quantité de grands polymères de gluténines, est le déterminant de la force de la pâte et lui confère de l'élasticité (Naeem *et al.*, 2012). Le rapport gliadines – gluténines influence ainsi fortement les qualités rhéologiques de la pâte, représentées par la force boulangère (w) de la farine.

Les gliadines sont des protéines solubles dans une solution hydro-alcoolique, dont la masse moléculaire est comprise entre 28 et 55 KDa. Cette fraction protéique était historiquement répartie en quatre groupes : α , β , ω et γ -gliadines sur la base de leurs profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide à faible pH (Shewry *et al.*, 2003). Plus récemment, la classification des gliadines a été modifiée sur la base de leurs séquences et leurs compositions en acides aminés, ainsi que leur masse moléculaire. Cette nouvelle classification conduit aux quatre classes ω 5-, ω 1,2-, α/β - and γ -gliadines (Wieser, 2007). A l'échelle génique, la plupart des gliadines sont contrôlées par six *loci* majeurs : trois *loci* *Gli-1*

qui sont situés sur les bras courts des chromosomes du groupe 1 et trois *loci* *Gli-2* situés sur les bras courts des chromosomes du groupe 6 (Payne, 1987). Sept *loci* mineurs codant pour des gliadines ont également été identifiés sur les bras courts des chromosomes du groupe 1 (*Gli-3A*, *Gli-4B*, *Gli-4D*, *Gli-5A*, *Gli-5B*, *Gli-5D* et *Gli-6A*) (voir synthèse faite par Shewry *et al.*, 2003). Le nombre de copies de gènes codant pour les différentes gliadines est très élevé, et varie d'un génotype à un autre. L'exemple des α -gliadines illustre bien cette complexité, car des analyses de clones BAC issus de différentes variétés de blés hexaploïdes ainsi que d'ancêtres du blé a permis d'identifier que cette classe de gliadines est à elle seule codée par un nombre de gènes variant de 25 à 150 (Anderson *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2004).

Les gluténines sont des protéines insolubles constituées de sous unités de haut poids moléculaire (HMW-GS) (de 67 à 88 KDa) et de faible poids moléculaire (LMW-GS) (de 32 à 35 KDa) stabilisées par des ponts disulfure (Shewry *et al.*, 2002; Wieser, 2007), qui s'organisent en larges macro-polymères au cours de la dessiccation du grain (Don *et al.*, 2006). Il existe deux types de HMW-GS, x- et y-, qui se différencient par leur taille ainsi que leur nombre de cystéines. Les LMW-GS sont réparties en six types (i-, s-, m-, B-, C- et D-) qui se différencient par leurs séquences en acides aminés (Johansson *et al.*, 2013). Les gluténines sont codées par six *loci* majeurs, et trois *loci* mineurs. Les HMW-GS sont principalement codées par des gènes situés aux *loci* *Glu-1* positionnés sur les bras longs des chromosomes du groupe 1 (Payne *et al.*, 1982), tandis que les LMW-GS sont codées par des gènes situés aux *loci* *Glu-3* positionnés sur les bras courts des chromosomes du groupe 1 (Singh and Shepherd, 1988). Les trois *loci* mineurs impliqués dans la synthèse des gluténines ont été identifiés sur les bras courts des chromosomes du groupe 1 (voir synthèse faite par Shewry *et al.*, 2003). Le nombre de gènes codant pour les gluténines est très différent selon leur classe. En effet, les LMW-GS sont codées par une famille multigénique dont le nombre exact de gènes est encore inconnu, mais est estimé entre 35 et 40 chez le blé tendre hexaploïde (D'Ovidio and Masci, 2004), tandis que les HMW-GS sont généralement codées par 6 gènes (Bonafede *et al.*, 2015).

2.2.2. Les non-prolamines

Les protéines non-prolamines sont réparties en trois fractions : les albumines, les globulines et les puroindolines. Les albumines et les globulines, bien que représentant chacune environ 10% des protéines totales du grain, n'ont que peu d'effet sur les caractéristiques physico-chimiques de la pâte. Elles contribuent cependant à la qualité nutritionnelle du blé car elles présentent un bon équilibre des acides aminés essentiels, et sont notamment riches en lysine (Feillet, 2000). Les puroindolines représentent quant à elles de 5 à 10% des protéines totales du grain, et bien qu'elles n'influencent pas directement la qualité de la farine, elles sont impliquées dans la dureté du grain (Morris, 2002; Pauly *et al.*, 2013) qui est un critère important pour les meuniers car il traduit l'état de cohésion de l'amidon et détermine la difficulté de mouture. Un indice de dureté trop élevé (blés « hard ») est associé avec une structure d'amidon grossière qui est endommagée à la mouture, et convient moins à la panification que des blés plus friables (blés « soft »).

2.3. Effets génétiques et environnementaux sur les protéines du grain

2.3.1. Effets génétiques et environnementaux sur la composition protéique des grains

De nombreuses études ont mis en évidence que l'abondance relative des différentes fractions protéiques est sous influences environnementale et génétique (Graybosch *et al.*, 1996; Branlard *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2001, 2013; Dupont *et al.*, 2006; Plessis *et al.*, 2013). D'un point de vue génétique, les variations de teneurs en gliadines et gluténines, ainsi que du rapport gliadines – gluténines d'une variété à une autre conduisent à des caractéristiques rhéologiques très différentes. Plusieurs études ont mis en évidence l'effet de la variabilité allélique des gènes codant pour les différentes prolamines sur les propriétés fonctionnelles de la farine (Payne, 1987; Shewry *et al.*, 1992; Branlard *et al.*, 2003; Bonafede *et al.*, 2015) et ont permis d'identifier des allèles favorables aux caractéristiques rhéologiques (pour exemple Bonafede *et al.*, 2015). Ces différences génétiques de composition protéique des grains représentent une source d'allèles favorables pour la sélection variétale, et expliquent également le fait que toutes les variétés ne puissent pas être utilisées en panification, même si leur concentration en protéines est élevée. Cependant, au sein des variétés communément cultivées pour des usages de panification, l'effet génétique sur la composition protéique s'avère limité vis-à-vis des effets environnementaux.

L'ensemble des facteurs environnementaux susceptibles de modifier la quantité d'azote des grains ont un impact sur sa composition protéique, du fait de l'existence de relations robustes entre la quantité d'azote du grain (et donc de protéines totales) et l'abondance relative des différentes fractions protéiques. Selon ces constantes, une augmentation de la quantité d'azote du grain engendre une augmentation de la proportion relative de gliadines au détriment des fractions non-prolamines (albumines, globulines et puroindolines), tandis que la proportion de gluténines reste inchangée (Triboi *et al.*, 2003; Saint Pierre *et al.*, 2008). Ces réponses contrastées des différentes fractions protéiques vis-à-vis de la disponibilité en azote modifient les caractéristiques rhéologiques de la farine, notamment la force boulangère sous l'influence du rapport gliadines – gluténines. Généralement, l'augmentation de la concentration en protéines va de pair avec la qualité de la farine en panification, notamment au travers d'une augmentation du volume du pain (Graybosch *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 2001). Dans ce sens, la concentration en protéines des grains est un marqueur pertinent des caractéristiques rhéologiques de la farine au sein des variétés communément cultivées pour des débouchés de panification.

2.3.2. Effets génétiques et environnementaux sur la concentration en protéines des grains

La prédiction approximative de la valeur technologique à l'aide de la concentration en protéines totale étant satisfaisante (Méléard, 2014), ce critère a été largement retenu pour juger de la qualité de la récolte du fait qu'il soit simple à quantifier depuis le développement d'outils de mesure spectrométriques dans le proche infra-rouge. La concentration en protéines est fortement soumise aux effets de l'environnement. Le principal facteur de variation étant la disponibilité de l'azote qui peut engendrer des variations du simple au double de la

concentration en protéines des grains (de 7 à 15% de matière sèche) (Dupont and Altenbach, 2003; Godfray *et al.*, 2010). Cependant, une part importante de la variance de concentration en protéines est expliquée par un effet génétique : par exemple il explique à lui seul plus de 20% de la variance de la concentration en protéines observée sur différentes expérimentations multi-locales (Le Gouis *et al.*, 2014) (Table 2-2 p.17). Cette part importante de variance de la concentration en protéines des grains sous contrôle génétique avait déjà été observée auparavant sur d'autres panels variétaux : par exemple des variations de l'ordre de 2 points ont été observées sur des variétés communément utilisées au Royaume-Uni (Snape *et al.*, 1993), et des variations de 5 points au sein d'une collection mondiale de blé aux origines diverses (Vogel *et al.*, 1978). Nous verrons plus bas que l'analyse directe de la variabilité génétique pour la concentration en protéines du grain est rendue difficile par la forte relation négative existant entre ce caractère et le rendement en grains (cf. paragraphe 5.1).

Table 2-2 : Part de variance de la concentration en protéines des grains imputée à la variété, à l'environnement et à l'interaction variété x environnement dans plusieurs dispositifs d'essais sous deux stratégies phytosanitaires traité (T) et non-traité (NT) (Le Gouis *et al.*, 2014) : INRA (réseau INRA pré-inscription), CTPS (réseau officiel d'inscription des variétés), Arvalis (réseau Arvalis post-inscription), ANR (réseau d'expérimentation projet ANR ProtNblé), et FSOV (réseau d'expérimentation projet FSOV 2010F).

Types d'essais	% protéines		
	Variété	Env	VxE
INRA-T	29%	50%	14%
INRA-NT	27%	51%	15%
CTPS-T-Nord	21%	62%	2%
Arvalis-T-Nord	14%	62%	11%
Arvalis-T-Centre	19%	58%	9%
Arvalis-T-Sud	15%	62%	10%
ANR-T (*)	17%	74%	7%
FSOV-T (**)	24%	62%	12%
Moy.	21%	60%	10%

T : protégé contre maladies, NT : non traité
 (*) ANR ProtNblé, Biogemma-INRA-Arvalis-Limagrain
 (**) FSOV Azote, INRA-Arvalis-CETAC-Limagrain

2.3.3. Classification des variétés à l'inscription

Les influences génétiques sur la concentration en protéines du grain, ainsi que sur leur composition protéique conditionnent les usages potentiels de la récolte. Ainsi, dès leur inscription au catalogue français, les variétés sont classées selon six catégories de qualité technologiques qui différencient les blés améliorants ou de force (A), les blés panifiables supérieurs (BPS), les blés panifiables (BP), les blés biscuitiers (BB), les blés autres usages

(BAU) et les blés impanifiables (BAU IMP) (GEVES, 2015). Cette classification, notamment basée sur la concentration en protéines ainsi que sur la force boulangère fournit une bonne estimation du potentiel protéique des variétés. Elle représente une aide aux agriculteurs dans le choix de variétés de qualité. En 2014, bien que 63% de la sole française de blé ait été semée en variétés de classes BAF et BPS, la concentration en protéines moyenne des blés a seulement atteint 11,1 % (FranceAgriMer, 2014). Ce constat met en évidence la nécessité d'améliorer le potentiel génétique de concentration en protéines des grains afin d'être en mesure de répondre aux attentes des industriels et aux exigences des marchés internationaux.

III Concentration en protéines et rendement : des variables intégratives interconnectées

L'amélioration de la concentration en protéines ne peut être perçue comme un objectif unique, car elle doit nécessairement ne pas intervenir au détriment du rendement qui demeure l'objectif prioritaire des programmes de sélection. Dans ce cadre, son amélioration est confrontée à des difficultés liées à la nature complexe et intégrative de ces deux variables.

3.1. Natures intégratives de la concentration en protéines et du rendement

La concentration en protéines et le rendement sont des caractères intégratifs qui dépendent de différents paramètres physiologiques appelés « composantes ». La concentration en protéines est ainsi calculée selon l'équation (1) :

$$(1) \text{ Concentration en protéines} = qN_{\text{tot}} \times 5,7 / M_{\text{Stot}}$$

Où qN_{tot} est la quantité totale d'azote des grains, 5,7 est le coefficient de conversion d'azote en protéines et M_{Stot} la biomasse totale de grains.

Ainsi, la concentration en protéines n'est autre que le quotient de la quantité de protéines accumulées dans les grains divisée par le rendement. Cette valeur n'est de ce fait pas uniquement liée à la capacité intrinsèque à accumuler des protéines, mais est également fortement dépendante de la biomasse des grains. Ce lien de dépendance implique que son amélioration doit nécessairement être accompagnée d'un suivi du rendement, car une augmentation de la concentration en protéines peut tout autant découler d'une accumulation accrue de protéines que d'une diminution de rendement.

Le rendement, qui est la masse de grains produits par unité de surface, peut être calculé selon l'équation (2) :

$$(2) \text{ Rendement} = NEm^2 \times NGE \times PMG / 1000$$

Où Nem^2 est le nombre d'épis par mètre carré, NGE le nombre de grains par épi, et PMG le poids de mille grains.

Le nombre d'épis par mètre carré peut être à son tour décomposé, et calculé selon l'équation (3) :

$$(3) NEm^2 = NPm^2 \times NEP$$

Où NPm^2 est le nombre de plantes par mètre carré et NEP le nombre d'épis par plante.

L'étude individuelle de ces composantes permet un diagnostic plus précis des causes de variations du rendement, mais permet également aux programmes de sélection de se focaliser sur l'une ou l'autre d'entre elles, si identifiée comme particulièrement limitante dans un contexte pédoclimatique donné. Les différentes composantes de rendement sont néanmoins sujettes à de très forts effets de compensation. Cela signifie que si une composante prend une valeur faible, suite à un événement biotique ou abiotique défavorable lors de son élaboration,

les composantes de rendement à déterminations postérieures disposent d'une forme de plasticité permettant d'accroître leur valeur propre. Ces phénomènes de compensation limitent l'impact d'aléas sur le rendement, sans toutefois permettre d'atteindre le niveau de rendement initialement attendu. Par extension, l'existence de ces fortes compensations restreint de fait la portée potentielle de programmes de sélection par caractère, hors cas particulier.

3.2. Elaboration de la concentration en protéines et du rendement au cours du cycle de développement

Les potentiels de concentration en protéines et de rendement d'une culture de blé s'établissent tout au long du cycle de développement de la plante. Les différentes composantes dont ils découlent sont mises en place successivement durant les phases végétative et reproductive. Les accumulations de biomasse et de protéines dont dépendent ces variables sont liées à l'activité des métabolismes azoté et carboné, l'un fournissant les hydrates de carbone et l'énergie, l'autre les acides aminés nécessaires à la formation des acides nucléiques et des protéines.

3.2.1. Composantes établies durant la phase végétative

La phase de développement végétatif est cruciale pour le rendement et la concentration en protéines d'une culture de blé, car c'est à cette période que se mettent en place les organes aériens et racinaires déterminant ses capacités à assimiler et à stocker l'azote et le carbone. Les capacités d'absorption de l'azote sont liées au développement de l'appareil racinaire et à son architecture (Laperche *et al.*, 2006), tandis que les capacités d'acquisition de carbone sont majoritairement gouvernées par la surface foliaire, l'architecture foliaire, ainsi que la teneur en azote des feuilles (Evans, 1989; Makino, 2011). La pleine expression de ces potentiels assimilatoires est dépendante de nombreux paramètres environnementaux tels que la température ainsi que les disponibilités en azote et en eau. L'azote et le carbone assimilés sont stockés sous formes minérales (nitrate principalement) ou organiques (amidon, hydrates de carbone solubles, protéines, acides aminés) dans les différents organes de la plante. La Rubisco, enzyme centrale de la photosynthèse, est présente en abondance dans les feuilles et représente une forme importante de stockage d'azote puisque 20 à 25% de l'azote foliaire est alloué à cette enzyme (Makino *et al.*, 1988).

3.2.1.1. Nombre d'épis par mètre carré

La performance agronomique d'une culture de blé repose sur de très nombreux points. Parmi ceux-ci, la densité du couvert est importante car elle détermine une part du potentiel de nombre d'épis par mètre carré. Elle s'établit dès la levée, et est largement soumise à la qualité du semis ainsi qu'aux conditions environnementales telles que l'humidité du sol ainsi que la température. Le nombre d'épis par mètre carré est également dépendant du nombre de talles émises par chaque plante en fin d'hiver. Le tallage est soumis à des effets environnementaux tels que la disponibilité en azote, mais aussi à des effets génétiques sous l'influence majeure

du gène *TIN* (Moeller *et al.*, 2014). Le blé possède une plasticité conséquente vis-à-vis du tallage car un nombre important d'ébauches de talles est mis en place précocement, mais les talles surnuméraires régressent par la suite si les conditions environnementales ne sont pas propices à leur développement (disponibilité de l'azote, compétition lumineuse du couvert) (Sinclair and Jamieson, 2006). Les nutriments contenus dans les talles « avortées » sont alors remobilisés vers les talles conservées. Cette plasticité de tallage permet des phénomènes de compensation entre le nombre de plantes par mètre carré et le nombre d'épis par plante. Ainsi, un peuplement insuffisant est partiellement compensé par un nombre d'épis par plante plus important, réduisant l'impact d'un peuplement faible sur le nombre d'épis par mètre carré.

3.2.1.2. *Surface foliaire*

Au cours du développement des phytomères successifs, la surface foliaire s'établit. Sa valeur intrinsèque ainsi que la teneur en azote des feuilles et l'architecture foliaire déterminent le potentiel de la culture à assimiler le carbone au travers de sa capacité à capter le rayonnement actif pour la photosynthèse (PAR) (Evans, 2013) dont dépend la production de biomasse. La biomasse foliaire et la teneur en azote des feuilles sont également importantes pour les protéines des grains car les feuilles représentent un pool d'azote potentiellement remobilisable. Dans ce sens, Martre *et al.* (2015) ont récemment mis en évidence dans un travail de modélisation que les capacités de stockage en azote dans les feuilles et les tiges avaient une importance déterminante sur le potentiel de concentration en protéines des grains des variétés. La surface foliaire est elle aussi soumise à des effets environnementaux. Par exemple, un apport d'azote augmente la surface foliaire ainsi que la teneur des feuilles en chlorophylles et en Rubisco qui améliorent le rendement photosynthétique (Delgado *et al.*, 1994; Makino, 2011), mais augmentent également la durée de vie des feuilles (Dupont *et al.*, 2006).

3.2.1.3. *Nombre de grains par épi*

Le nombre de grains par épi est lui aussi déterminé au cours de la phase végétative. Il s'établit dans les 20 à 30 jours qui précèdent la floraison. Des études ont mis en évidence qu'il était impacté linéairement sur cette période par le quotient photothermique qui représente le rapport entre le PAR et la température (Fischer, 1985; Abbate *et al.*, 1995). Le produit du nombre d'épis par mètre carré et du nombre de grains par épi donne accès au nombre de grains par mètre carré, que de nombreuses études ont trouvé fortement corrélé au rendement (voir par exemple Slafer and Andrade, 1993; Bustos *et al.*, 2013). L'établissement des composantes de rendement, de la surface foliaire ainsi que la quantité d'azote assimilée au cours de la phase pré-floraison aboutit à un statut à floraison qui détermine une grande part des capacités de rendement final de la culture. En effet, l'unique composante de rendement à déterminisme post-floraison est le PMG, qui, bien que soumis à des effets environnementaux, est fortement génotype-dépendant en l'absence de stress.

3.2.2. Effet de la précocité à floraison sur les composantes

La transition entre les phases végétative et reproductive est marquée par la floraison. Ce stade de développement correspond à la libération de pollen qui permet la fécondation des ovules. Bien que chez le blé la libération du pollen ait lieu avant la sortie des étamines de la fleur, le stade floraison est considéré comme atteint lorsque 50% des épis présentent des étamines visibles sur 50% de leurs fleurs. La transition florale du blé d'hiver est soumise à la fois à des paramètres environnementaux (température et photopériode) et à des effets génétiques et développementaux. Ainsi, dans des conditions environnementales comparables, toutes les variétés ne présenteront pas la même précocité à floraison. Cette variabilité de précocité est principalement affectée par des polymorphismes alléliques pour les gènes impliqués dans la voie de vernalisation (*VRN1*, *VRN2* et *VRN3*), ainsi que dans la voie de perception de la photopériode (*PPD1*) (Distelfeld *et al.*, 2009). Cette plasticité de précocité en réponse à l'environnement, avantageuse dans l'adaptabilité du blé à différents climats, implique cependant que la durée de la phase végétative n'est pas égale d'une variété à une autre. Les variétés plus tardives auront ainsi plus de temps pour développer leurs organes structuraux et photosynthétiques, et auront généralement de plus forts potentiels de rendement, pour peu que leur caractère tardif ne les soumette pas à des stress environnementaux de fin de cycle.

3.2.3. Composantes établies durant le développement du grain

Le développement du grain est déterminant pour l'élaboration du rendement et de la concentration en protéines. Il se décompose en trois grandes étapes : une phase de division cellulaire, une phase de remplissage du grain en réserves, puis une phase de maturation. Les différents processus biologiques impliqués dans chaque phase sont mis en place graduellement, et ne sont pas automatiquement stoppés dès l'apparition de processus impliqués dans la phase suivante. La mesure la plus précise du développement du grain est exprimée en degrés-jours après floraison (°CJ), car elle tient compte des effets positifs de la température sur la vitesse de développement du grain (Altenbach *et al.*, 2003).

3.2.3.1. Phase de division cellulaire et potentiel de PMG

L'étape de division cellulaire intervient de 0 à 250 °CJ (Nadaud *et al.*, 2010; Shewry *et al.*, 2012). Au niveau de l'albumen, elle est marquée par des processus de cellularisation, différenciation, division et expansion cellulaires. Le processus de différenciation cellulaire permet la formation des différents types cellulaires de l'albumen, notamment la couche à aleurone et l'albumen amylicé qui sont les organes de stockage principaux. Il est communément admis que le nombre final de cellules de l'albumen est un déterminant majeur du volume potentiel du grain (Brocklehurst, 1977). Ce caractère, sous contrôle génétique, détermine les capacités de stockage du grain et par ce biais le potentiel génétique de PMG.

3.2.3.2. Accumulation de l'amidon et des protéines dans le grain

Bien que l'accumulation de protéines structurelles (albumines, globulines et puroindolines) débute dès la fécondation (Triboi *et al.*, 2003), l'étape de remplissage du grain qui correspond à l'accumulation de réserves d'amidon et de protéines du gluten est primordiale dans l'élaboration du rendement et de la concentration en protéines. Les dynamiques d'accumulation des protéines de réserve et d'amidon dans le grain sont relativement similaires. Elles débutent aux alentours de 150 °CJ pour les protéines (Triboi *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2006) et 200 °CJ pour l'amidon (Dupont *et al.*, 2006), et sont maintenues à un rythme élevé jusqu'à 600 °CJ (Triboi *et al.*, 2003). Elles se poursuivent ensuite de manière plus lente, et l'accumulation d'amidon cesse généralement plus précocement que l'accumulation de protéines (aux alentours de 700°CJ et 750-800°CJ respectivement) (Triboi *et al.*, 2003; Dupont and Altenbach, 2003; Dupont *et al.*, 2006).

L'accumulation d'amidon est un déterminant majeur du rendement car il représente de 65 à 75% de la matière sèche du grain (Dupont and Altenbach, 2003). L'amidon est composé d'amylose (30%) et d'amylopectine (70%), qui sont tous deux des polymères de sucres. Ces polymères sont formés sous l'action de différentes enzymes (ADP glucose-phosphorylase, starch synthase, enzymes de branchement) au niveau des amyloplastes dans les cellules internes de l'albumen amyloacé, et s'organisent ensuite en granules d'amidon (Shewry *et al.*, 2012). L'accumulation d'amidon dans le grain est très dépendante de l'activité photosynthétique réalisée au cours du remplissage du grain, et de ce fait de la quantité de rayonnement intercepté. La vitesse d'accumulation d'amidon étant relativement constante, la quantité d'amidon assimilée dans le grain est directement dépendante de la durée de remplissage du grain et donc de la persistance d'une activité photosynthétique au cours du remplissage. Les facteurs environnementaux ont une influence forte sur cette durée de remplissage, en particulier la température ainsi que les disponibilités de l'eau et de l'azote, et impactent par ce biais le rendement. La température optimale pour l'accumulation d'amidon, qui maximise le rendement, se situe entre 15 et 20°C. Une élévation des températures est pénalisante pour le rendement, car elle affecte d'une part la durée du cycle de remplissage du grain (Altenbach *et al.*, 2003), mais engendre également l'inactivation d'enzymes ainsi qu'une baisse de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse d'amidon (Hurkman *et al.*, 2003). Les stress thermiques sont responsables du phénomène bien connu d'« échaudage », qui conduit à des grains ridés et de petite taille du fait de leur mauvais remplissage. De la même manière que la température, les stress hydriques et azotés affectent le rendement par une réduction de la durée de remplissage du grain.

L'accumulation des différentes fractions protéiques du grain n'intervient pas de manière synchrone. Les premières fractions accumulées sont les albumines, les globulines et les puroindolines. Ces protéines structurelles sont accumulées linéairement de la fécondation jusqu'aux environs de 500 à 600 °CJ (Triboi *et al.*, 2003). L'accumulation des protéines de réserve (gliadines et gluténines) intervient plus tardivement, d'environ 150 °CJ à près de 800°CJ (Triboi *et al.*, 2003). Elles sont majoritairement stockées dans la couche à aleurone de l'albumen. L'accumulation de protéines dans le grain est bien moins sensible que l'accumulation de l'amidon à la réduction de la durée de remplissage, quel que soit le stress

considéré. En effet, tandis que l'amidon est synthétisé à partir de sucres assimilés au cours du remplissage, une grande partie des protéines du grain provient de la remobilisation d'azote stocké dans les parties végétatives de la plante. La vitesse de dégradation protéique étant fonction de la température, il existe un effet de compensation entre durée de remplissage en temps thermique et vitesse d'accumulation des protéines, contrairement à la synthèse d'amidon (Dupont *et al.*, 2006). Cette différence fondamentale induit qu'une réduction de la durée de remplissage du grain, qui est défavorable au rendement, est accompagné d'une augmentation de la concentration en protéines des grains.

3.2.3.3. *Maturation du grain*

La phase de maturation du grain qui entraîne l'arrêt des voies métaboliques (au travers des processus biologiques de mort cellulaire programmée et de dessiccation) n'a pas d'influence démontrée sur le rendement et la concentration en protéines. Cette phase est chevauchante avec la phase de remplissage, car la mort cellulaire programmée qui touche de manière stochastique les cellules de l'albumen amyloacé débute lentement dès 16 JAF, culmine aux environs de 30 JAF et aboutit à la fragmentation de l'ADN de l'ensemble des cellules de l'albumen amyloacé (Young and Gallie, 1999). Le statut hydrique du grain est également fortement modifié. En effet, le contenu en eau du grain qui a atteint son maximum vers 10 à 14 JAF pour environ deux à trois semaines (appelé plateau hydrique) (Schnyder and Baum, 1992) va rapidement chuter. Le grain atteint alors sa masse sèche maximale.

3.3. **Interaction entre les métabolismes azotés et carbonés**

Au travers de l'établissement de leurs composantes respectives, la concentration en protéines et le rendement sont directement dépendants de l'activité des métabolismes azoté et carboné. Or, il existe une étroite interconnexion entre ces deux métabolismes centraux. L'absorption et l'assimilation d'azote sont des processus actifs qui nécessitent de l'énergie et des squelettes carbonés issus du métabolisme du carbone, tandis que l'assimilation de carbone est dépendante d'enzymes et de protéines (chlorophylles et Rubisco en particulier) issues du métabolisme azoté. Ainsi, les capacités à assimiler le carbone influencent l'absorption d'azote et inversement. La coordination des métabolismes azotés et carbonés à l'échelle de la plante suggère l'existence de dialogues moléculaires complexes avec des fonctions de rétrocontrôles, permettant une réponse cohérente des deux métabolismes aux facteurs environnementaux (disponibilité en nutriments ou en énergie lumineuse par exemple) (Lejay *et al.*, 2008; Ruffel *et al.*, 2014).

3.3.1. Interaction C / N au cours du remplissage du grain

L'absorption d'azote après floraison est à la fois favorable au rendement et à la concentration en protéines au travers de deux effets distincts. D'une part, elle retarde la sénescence foliaire, ce qui augmente significativement la durée de remplissage du grain au profit de l'accumulation d'amidon et donc du rendement. D'autre part, une grande partie de

cet azote est rapidement dirigé vers le grain (Oscarson *et al.*, 1995b) au profit des protéines de réserve et donc de la concentration en protéines des grains. Plusieurs études ont mis en évidence que cette absorption d'azote tardive était plus favorable à la concentration en protéines qu'au rendement (Monaghan *et al.*, 2001; Kichey *et al.*, 2007; Gooding *et al.*, 2007), du fait que l'accumulation de protéines est principalement limitée par la source (azote disponible au niveau du grain) tandis que le rendement est, en l'absence d'évènements climatiques défavorables, limité par le puits (volume du grain) (Martre *et al.*, 2003). Chez le blé, la majorité de l'azote du grain (60 à 95 %) est issue de la remobilisation d'azote absorbé durant la phase végétative, tandis que 5 à 40% est issue d'absorption post-floraison (Van Sanford and MacKown, 1987; Palta and Fillery, 1995; Kichey *et al.*, 2007; Bogard *et al.*, 2010).

3.3.2. Régulation de l'absorption d'azote

L'absorption d'azote est soumise à une régulation complexe qui est fonction du rapport entre la disponibilité de l'élément dans l'environnement et la demande de la plante. Des études conduites en conditions hydroponiques ont mis en évidence que le blé a la capacité d'absorber l'azote malgré des disponibilités très faibles en l'absence d'autres stress environnementaux (Oscarson *et al.*, 1995a). Ainsi, la demande de la plante est probablement un élément majeur dans la détermination de l'absorption, bien que les dialogues croisés entre métabolismes azoté, carboné et absorption d'azote soient encore très obscurs. Cette notion de demande en azote de la plante est à la fois fonction de son besoin en protéines structurelles pour les organes en croissance, mais aussi de son statut azoté au niveau d'organes déjà formés (Ruffel *et al.*, 2014). Cela suggère que la plante régule en continu son absorption d'azote afin de l'ajuster à ses capacités à accumuler du carbone.

IV Absorption et assimilation de l'azote

La régulation de l'absorption et de l'assimilation d'azote est réalisée par des mécanismes fins opérant à une échelle moléculaire. C'est donc possiblement à cette échelle que des potentialités de variabilité génétique avec effets macroscopiques peuvent résider. Les nombreuses études réalisées sur les plantes modèles, notamment *Arabidopsis thaliana*, ont permis de grandement améliorer les connaissances sur les processus impliqués dans l'absorption et l'assimilation d'azote chez les plantes (voir pour synthèses Miller *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007; Glass, 2009; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Bien que tous les gènes impliqués dans ces processus ne soient pas encore caractérisés chez le blé, la conservation de certains acteurs centraux suggère que le modèle génique d'absorption et d'assimilation de l'azote développé chez *A. thaliana* puisse lui être transposé. Cependant, cela n'exclut pas l'existence de différences ponctuelles. Le modèle présenté dans cette partie a très majoritairement été construit à partir d'observations réalisées sur *A. thaliana*.

4.1. Absorption d'azote

En conditions de sol aérobie, ce qui est classiquement le cas pour la culture de blé, l'azote est préférentiellement absorbé sous forme de nitrates (NO_3^-) (Maathuis, 2009), bien que la plante dispose de mécanismes permettant l'absorption d'ammonium (NH_4^+) et d'acides aminés. L'absorption des nitrates intervient principalement au niveau des cellules racinaires jeunes. Elle est deux à trois fois plus élevée dans les quatre premiers centimètres qui surplombent l'apex racinaire que dans le reste de la racine. Néanmoins, l'expression de gènes codant pour des transporteurs de nitrate dans la partie mature de la racine suggère qu'elle participe également à l'absorption (Naoz *et al.*, 2003). Les plantes ont développé la faculté de moduler leur architecture racinaire en fonction de la disponibilité en nitrates du milieu, qui affecte à la fois le nombre ainsi que la position des sites d'initiation de racines latérales (Malamy and Ryan, 2001). Ainsi, lorsque le milieu ne contient pas ou peu de nitrates, l'initiation de racines latérales est inhibée et la racine croît uniquement en longueur. Lorsque la racine atteint une zone plus riche en nitrates, l'initiation de racines latérales est désinhibée et les racines prospectent alors efficacement le volume de sol environnant. Ce mécanisme adaptatif présente l'avantage de favoriser la prolifération de racines latérales dans les zones riches en nitrates, et d'ainsi optimiser la quantité de carbone alloué aux racines pour répondre aux besoins azotés de la plante.

L'absorption racinaire des nitrates dans le milieu est un processus actif qui nécessite des apports énergétiques issus du métabolisme du carbone. Il repose principalement sur l'action de deux familles de transporteurs racinaires différenciées par leur affinité pour le nitrate : les transporteurs à basse affinité (« Low Affinity Transport System » ; LATS) et les transporteurs à haute affinité (« High Low Affinity Transport System » ; HATS). En plus de leur affinité pour leur substrat, ces deux familles se différencient par des vitesses de saturation contrastées. Le HATS a une affinité forte pour le nitrate associée à une saturation rapide tandis que le LATS a une affinité faible pour le nitrate associée à une saturation lente. Au sein de ces deux

catégories, les transporteurs sont classés en sous-catégories selon leur inductibilité par les nitrates : certains transporteurs sont constitutifs (cLATS, cHATS), tandis que d'autres sont inductibles par le nitrate (iLATS, iHATS).

4.1.1. Système de transport à basse affinité

Le LATS racinaire est constitué de transporteurs appartenant à la famille des NRT1, qui compte 53 membres connus chez *A. thaliana* (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Les transporteurs de la famille des NRT1 ne sont pas uniquement impliqués dans l'absorption des nitrates du sol, mais également dans le transport de cet élément entre les différents organes de la plante. Parmi les 53 gènes codant pour des NRT1 d'*A. thaliana*, 51 présentent des profils d'expression différents selon les tissus de la plante (Tsay *et al.*, 2007), suggérant qu'ils détiennent des fonctions bien spécifiques.

Le premier gène de la famille des NRT1 à avoir été isolé, *NRT1.1* (historiquement appelé *CHL1* ; Tsay *et al.*, 1993), est également celui qui a le plus été étudié. Il est fortement exprimé dans l'épiderme des racines jeunes, dans le cortex et l'endoderme des portions racinaires plus matures (Huang *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001), mais également dans les jeunes feuilles et les fleurs en développement (Guo *et al.*, 2001). Sa protéine, localisée sur la membrane plasmique des cellules, a la particularité unique au sein des transporteurs de nitrates d'être bivalente quant à son affinité pour son substrat. Lorsque la protéine NRT1.1 n'est pas phosphorylée sur le résidu thréonine 101, elle a une affinité faible pour le nitrate et intervient dans le LATS, tandis que la phosphorylation de ce résidu modifie son affinité pour le nitrate et lui confère une fonction de HATS (Liu and Tsay, 2003).

Le transporteur NRT1.1 occupe une place particulière au sein de la famille des NRT1, car il est à la fois un transporteur et un senseur de nitrates (Gojon *et al.*, 2009), ce qui lui vaut l'appellation de « transcepteur ». L'étude de mutants *nrt1.1* (gène *NRT1.1* non exprimé ou non fonctionnel) chez *A. thaliana* suggère en effet que ce gène soit impliqué dans d'autres mécanismes que le transport de nitrates, car cette mutation engendre non seulement une baisse de l'absorption (Tsay *et al.*, 1993; Remans *et al.*, 2006), mais également une accumulation des hydrates de carbone, une baisse du pH cytosolique ainsi qu'une modification de la croissance des organes néoformés tant au niveau racinaire qu'aérien (Guo *et al.*, 2001). Au niveau racinaire, la mutation *nrt1.1* inhibe la capacité de la plante à stimuler spécifiquement l'élongation de racines latérales dans les zones de sol riches en nitrates, ce qui réduit considérablement l'absorption d'azote (Remans *et al.*, 2006). Le contrôle de NRT1.1 sur l'architecture racinaire a été mis en évidence grâce aux effets contradictoires du L-glutamate exogène et des nitrates sur la croissance de la racine. Le L-glutamate, qui est une molécule de signal exogène révélant la proximité d'une plante concurrente, a pour effet de fortement inhiber la croissance racinaire. Lorsque du nitrate et du L-glutamate sont présents simultanément, la répression de croissance racinaire exercée par le L-glutamate est annulée chez le génotype « sauvage » (non-muté). Chez le mutant *nrt1.1*, la présence de nitrates n'annule pas l'effet du L-glutamate et la racine ne grandit pas (Walch-Liu and Forde, 2008).

La répression de croissance des racines latérales par NRT1.1, lorsque la teneur en nitrates du milieu est faible, est liée à sa fonction de transport d'auxine (Krouk *et al.*, 2010; Mounier *et al.*, 2014). NRT1.1 promeut un transport basipète de l'auxine lorsque la teneur en azote du milieu est faible afin d'encourager une croissance verticale de la racine, permettant une meilleure exploration du sol ainsi qu'une optimisation du carbone alloué au système racinaire pour l'absorption d'azote. En plus du contrôle morphologique, NRT1.1 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de transporteurs racinaires appartenant au HATS en condition de forte disponibilité en azote du milieu (Krouk *et al.*, 2006). Ce mécanisme prévient les absorptions d'azote excessives.

Le second membre du LATS impliqué dans l'absorption des nitrates est NRT1.2, dont l'expression est constitutive dans l'épiderme racinaire (Huang *et al.*, 1999). Par une approche de mutants, Krouk *et al.* (2006) ont mis en évidence qu'il participe significativement à l'absorption de nitrates, mais n'est *à priori* pas impliqué dans des fonctions annexes de régulations morphologiques ni de rétrocontrôles sur d'autres transporteurs.

Les autres membres de la famille des NRT1 sont impliqués dans le transport interne des nitrates. Le transporteur NRT1.5, localisé dans la membrane plasmique des cellules du péricycle racinaire, est impliqué dans le chargement des nitrates dans le xylème pour leur transport à longue distance vers les organes aériens (Lin *et al.*, 2008). NRT1.8 est ensuite impliqué dans le déchargement du xylème (Lin *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). D'autres NRT1 sont spécifiquement impliqués dans le transport des nitrates au sein des différents organes. Par exemple, NRT1.4 et NRT1.6 sont respectivement impliqués dans le transport des nitrates dans le pétiole des feuilles (Chiu *et al.*, 2004) et dans les tissus vasculaires des siliques et du funicule (Almagro *et al.*, 2008), permettant de convoier les nitrates vers les feuilles et l'embryon.

Chez le blé, un seul membre appartenant à la famille NRT1 avait fait l'objet d'études jusqu'à récemment (Wang *et al.*, 2011). L'état des connaissances des NRT1 du blé devrait cependant évoluer dans les années à venir, car 16 membres potentiels de cette famille (homologues aux NRT1 d'*A. thaliana*) ont récemment été proposés (Buchner and Hawkesford, 2014).

4.1.2. Système de transport à haute affinité

Le HATS est constitué de transporteurs appartenant à la famille des NRT2, qui compte sept membres chez *A. thaliana*. Le transporteur NRT2.1 occupe une place déterminante dans l'absorption de nitrates car le mutant *nrt2.1* accuse une baisse de l'absorption liée au HATS de l'ordre de 75%, associée à une teneur en nitrate des feuilles affaiblie (Filleur *et al.*, 2001). Le transporteur NRT2.1 fonctionne en interaction avec la protéine NAR2, dont la mutation perturbe également l'absorption (Orsel *et al.*, 2006). Le gène codant pour NRT2.1 est inductible par les nitrates, mais fortement réprimé lorsque la concentration en nitrates est élevée (supérieure à 1 mM) (Girin *et al.*, 2007). Cette régulation, qui peut paraître antagoniste de prime abord, semble en réalité être un exemple même d'adaptabilité des plantes à leur environnement. En effet, lorsque les nitrates sont rares, *NRT2.1* est exprimé pour exploiter sa

haute affinité pour le nitrate, et à l'inverse, lorsque les nitrates sont abondants, son expression est réprimée pour prévenir des niveaux d'absorption inutiles et coûteux en énergie. La voie de régulation négative de *NRT2.1* est à priori double, car ce gène est à la fois réprimé par la teneur en nitrates du milieu, mais aussi par des rétrocontrôles systémiques liés au statut azoté de la plante (Girin *et al.*, 2007). La répression de *NRT2.1* liée à la disponibilité forte des nitrates du milieu fait intervenir NRT1.1, car le mutant *nrt1.1* présente une répression réduite de *NRT2.1* même en conditions de nitrates élevés dans le milieu (Munos *et al.*, 2004). En revanche, la nature du rétrocontrôle lié au statut azoté de la plante (autrement dit son niveau de nutrition azotée) fait débat, car certains auteurs affirment qu'il est effectué par des métabolites azotés comme la glutamine (Vidmar *et al.*, 2000; Nazoa *et al.*, 2003; Girin *et al.*, 2007), tandis que d'autres soutiennent que le nitrate en est lui-même l'effecteur (Siddiqi *et al.*, 1990; King *et al.*, 1993; Wang, 2004). Le transporteur NRT2.1 est également impliqué dans la réponse à la levée de carence, car *NRT2.1* est fortement exprimé dans les heures qui suivent un apport d'azote chez des plantes carencées (Okamoto *et al.*, 2003). Cette activation transitoire ne dure cependant que quelques jours.

Un second membre de la famille NRT2, NRT2.2, intervient pour près de 30% dans l'absorption de nitrates racinaires liée au HATS (Filleur *et al.*, 2001). Le gène codant pour ce transporteur présente un profil expressionnel très comparable à celui du gène codant pour NRT2.1 (Okamoto *et al.*, 2003). Ensemble, NRT2.1 et NRT2.2 représentent la quasi-totalité de l'absorption racinaire liée au HATS (Cerezo *et al.*, 2001).

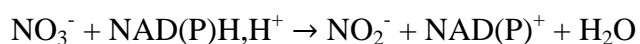
D'autres membres de la famille des NRT2 sont connus chez *A. thaliana* pour leur implication dans le transport interne de nitrates entre les différents organes. Par exemple, NRT2.7 est impliqué dans le transport de nitrate dans les graines (Chopin *et al.*, 2007).

Chez le blé, NRT2.1 est le seul membre de la famille des NRT2 à avoir été caractérisé jusqu'à présent (Yin *et al.*, 2007).

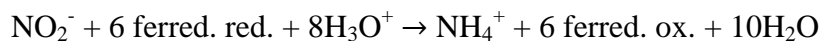
4.2. Assimilation d'azote

4.2.1. Réduction des nitrates

Les nitrates absorbés sont soit stockés dans les vacuoles des cellules en vue d'une utilisation ultérieure, soit assimilés directement. Les processus impliqués sont actifs, et nécessitent à nouveau de l'énergie. Comme les plantes n'assimilent pas l'azote sous forme de nitrates mais d'ammonium (NH₄⁺), les nitrates absorbés doivent subir deux étapes de réductions successives, qui conduisent à la formation de nitrites (NO₂⁻), puis d'ammonium avant leur assimilation dans des molécules carbonées (Figure 2-8A p.32). La part de cette réduction intervenant dans les racines et dans la partie aérienne est variable selon les espèces, mais semble intervenir de manière équilibrée entre les racines et la partie aérienne chez le blé (Kirkman and Mifflin, 1979; Champigny, 1993). La réduction des nitrates en nitrites est effectuée dans le cytoplasme des cellules par l'enzyme Nitrate Réductase (NR) :



Ensuite, la réduction des nitrites en ammonium est effectuée par l'enzyme Nitrite Réductase (NiR) dans les plastes des racines ou dans les chloroplastes des feuilles. L'origine du pouvoir réducteur nécessaire à la réaction est dépendante du site de réduction ; dans les racines (1), le pouvoir réducteur est le NADPH, tandis qu'il provient de la ferrédoxine dans les feuilles (2).



Au niveau transcriptionnel, les gènes codant pour NR et NiR sont globalement régulés de la même manière chez *A. thaliana*. Leurs homologues ont été décrits chez le blé, et leurs séquences sont disponibles (Boisson *et al.*, 2005). Les gènes *NR* et *NiR* sont tous deux fortement activés par les nitrates, *NiR* étant généralement plus fortement exprimé que *NR* afin d'éviter les accumulations de nitrites qui sont des composés toxiques pour les plantes. Ces gènes sont également activés par les sucres issus de la photosynthèse ainsi que par la lumière *via* la voie des phytochromes, afin de satisfaire les besoins en azote du métabolisme carboné (Lillo, 2008). A l'inverse, une accumulation de métabolites azotés tels que la glutamine réprime les gènes *NR* et *NiR*, probablement pour éviter une accumulation d'ammonium. Ces mécanismes de régulation des voies d'absorption et de réduction de l'azote coordonnent les métabolismes azotés et carbonés, en calant le rythme d'absorption et de réduction de l'azote sur celui de la synthèse d'hydrates de carbone.

Le contrôle transcriptionnel de *NR* est cependant secondaire, car cette enzyme est sujette à un contrôle post-traductionnel fort. Son activité est en effet fortement dépendante de son état de phosphorylation, la NR n'étant active qu'à l'état phosphorylé (Miller and Cramer, 2005; Lillo, 2008). Ce contrôle post-traductionnel de l'activité enzymatique permet à la plante une réponse rapide aux variations des besoins en ammonium par une phosphorylation / déphosphorylation massive des enzymes NR disponibles. Ces mécanismes de réponse extrêmement réactifs de l'activité NR sont probablement liés aux natures toxiques des nitrites et de l'ammonium.

4.2.2. Assimilation de l'ammonium

L'assimilation de l'ammonium issu de la réduction des nitrates (mais également de la photorespiration ainsi que du recyclage des acides aminés) dans des molécules carbonées est réalisée au sein des plastes et des chloroplastes par un mécanisme actif impliquant les protéines glutamine synthetase 2 (GS2) et glutamine:oxoglutarate aminotransferase (GOGAT), appelé cycle GS/GOGAT. Le cycle GS/GOGAT nécessite l'apport de 2-oxoglutarate qui est également un intermédiaire du cycle de Krebs. La GS2 catalyse l'amination ATP-dépendante (en ajoutant un ammonium) du glutamate pour former la glutamine, et la GOGAT catalyse le transfert d'un groupement amide de la glutamine au 2-oxoglutarate pour produire deux molécules de glutamate (Figure 2-8A p.32). Une de ces deux molécules de glutamate servira pour réalimenter le cycle, et la seconde sera utilisée pour la synthèse d'acides aminés. Le produit du cycle GS/GOGAT est réversible, car le glutamate peut être désaminé par l'enzyme Glutamate Déshydrogénase (GDH) afin d'obtenir une

molécule de 2 –oxoglutarate ainsi qu’une molécule d’ammonium. Cette réaction peut intervenir dans des processus de régulation de l’équilibre carbone / azote des cellules.

Un seul gène codant pour la GS2 chloroplastique est présent chez toutes les espèces étudiées jusqu’à ce jour, dont le blé (Bernard *et al.*, 2008). En revanche, il existe deux formes de GOGAT. La Fd-GOGAT utilise la ferrédoxine comme pouvoir réducteur, tandis que la NADH-GOGAT utilise le NADH (Vanoni *et al.*, 2005). Ces deux formes de GOGAT ne sont pas présentes dans les mêmes proportions selon les tissus. La Fd-GOGAT prédomine dans les chloroplastes des cellules photosynthétiques, tandis que la NADH-GOGAT est la plus abondante dans les plastes des cellules non-photosynthétiques.

La régulation du cycle GS-GOGAT est soumise à différents stimuli, notamment la lumière, la disponibilité de l’ammonium, ainsi que l’activité du cycle lui-même au travers de la concentration en glutamine qui induit l’expression de *GOGAT* (Lillo, 2008). L’induction de *GOGAT* par la glutamine permet le maintien d’un équilibre GS/GOGAT. La lumière, synonyme d’approvisionnement énergétique, active *GS2* et engendre une accélération de l’entrée de nitrates et d’ammonium dans les feuilles qui se traduit par l’augmentation de l’activité GS/GOGAT.

La compréhension des mécanismes d’assimilation d’azote présente des enjeux forts car plusieurs études ont mis en évidence la co-localisation de QTLs de variables d’intérêts avec les gènes *GS2* et *GOGAT*. Chez le blé tendre, des allèles favorables de *GS2* ont été associés avec de forts niveaux d’absorption et des teneurs en protéines des grains élevées (Li *et al.*, 2010). Un QTL d’efficacité d’utilisation de l’azote co-localise également avec le gène *NADH-GOGAT* sur le chromosome 3B (Quraishi *et al.*, 2011). Chez le blé dur, Gadaleta *et al.*, (2011) ont mis en évidence la co-localisation de copies de gènes codant pour *GS2* et *GS1* avec quatre QTL associés à la concentration en protéines des grains. Ces exemples non exhaustifs d’études pointent du doigt l’importance potentielle de la variabilité allélique portée par les gènes impliqués dans l’assimilation d’azote.

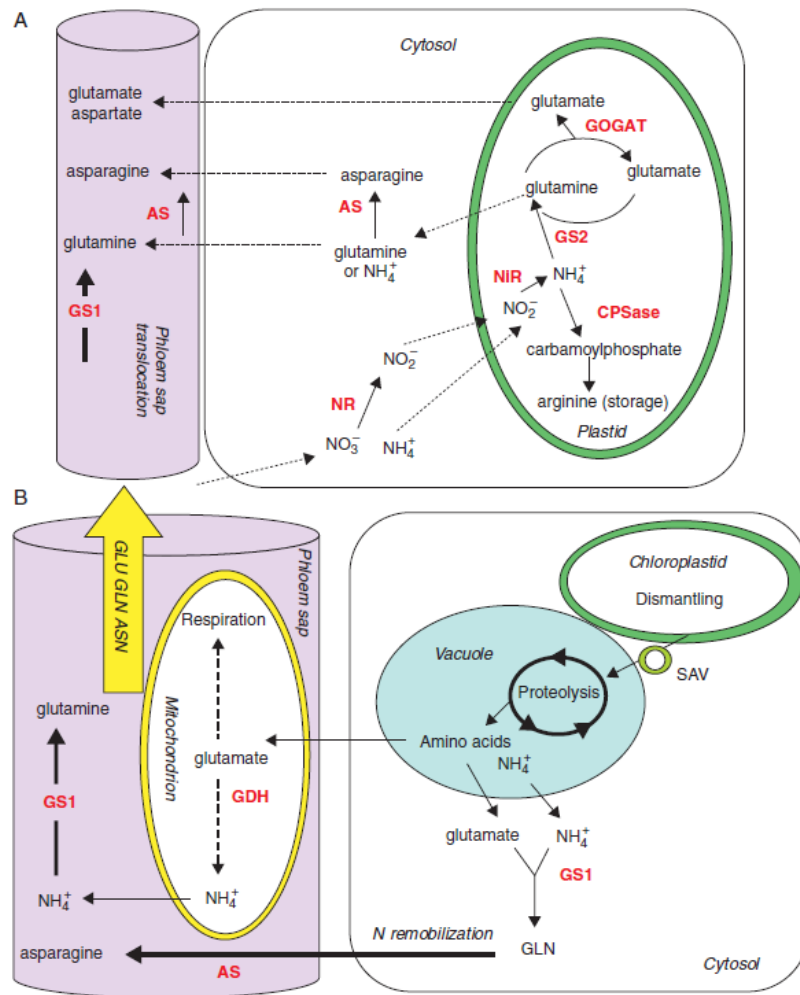


Figure 2-8: Schématisation des mécanismes impliqués dans l'assimilation et la remobilisation d'azote chez les plantes. Dans les feuilles jeunes (A), les nitrates sont successivement réduits en nitrites puis en ammonium par les enzymes NR et NiR. L'ammonium est ensuite intégré à des molécules carbonées par le cycle GS/GOGAT. La glutamine, le glutamate ainsi que l'asparagine synthétisée par l'enzyme AS à partir de glutamine sont ensuite intégrés au phloème pour être transportés vers d'autres organes. Dans les feuilles sénescents (B), le démantèlement et la protéolyse des protéines chloroplastiques libèrent de l'ammonium et du glutamate. Dans le cytoplasme, l'enzyme GS1 forme de la glutamine qui est exportée via le phloème. Dans le phloème, GS1, GDH et ASN1 sont les principales enzymes impliqués dans la synthèse de la glutamine, du glutamate et de l'asparagine (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

4.3. Remobilisation de l'azote

Lorsque les organes des plantes entrent en sénescence, une partie de l'azote qu'ils contiennent sous forme de protéines est dégradée puis remobilisée vers les organes en croissance. Ces organes sont les feuilles les plus jeunes durant la phase de croissance végétative ou les grains au cours de leur remplissage, la remobilisation de l'azote étant aussi efficace de feuille à feuille que de feuille à grain (Malagoli *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2008; Lemaitre *et al.*, 2008). Les feuilles constituent une source importante d'azote car elles sont riches en protéines, notamment en protéines dans les plastes dont la Rubisco. La sénescence foliaire débute au niveau des chloroplastes, avec la présence d'un grand nombre de protéases et de ROS (reactive oxygen species) dans cet organite (Martínez *et al.*, 2008). La Rubisco est dégradée en « Rubisco-containing bodies » (RCB) dans le chloroplaste, tandis que les RCB et les protéines du lumen sont dégradées et stockées dans la vacuole centrale avant destruction du chloroplaste (Ishida and Yoshimoto, 2008). La remobilisation de l'azote stocké dans les organes végétatifs fait principalement intervenir les enzymes de glutamine synthétase 1 cytoplasmique (GS1), glutamate déshydrogénase (GDH) ainsi que d'asparagine synthétase (AS). Ces trois enzymes clés permettent de convertir le glutamate et l'aspartate issus de la dégradation des protéines foliaires en glutamine et asparagine qui sont les principales formes azotées transportées à longue distance (Figure 2-8B p.32), et servent de base à l'élaboration de protéines dans les organes en croissance. L'étude comparée des cinétiques de teneur en Rubisco des feuilles et d'accumulation d'azote dans le grain suggère que la translocation d'azote depuis les organes végétatifs soit principalement limitée par la disponibilité du substrat dans les organes sources (Bertheloot *et al.*, 2008).

L'initiation du processus de sénescence est dépendante de la disponibilité en azote, car le maintien d'une absorption d'azote après floraison retarde la sénescence foliaire (Thomas and Howarth, 2000; Kichey *et al.*, 2007). Ce retard de sénescence est lié au fait que l'azote absorbé après floraison renforce la teneur en azote des feuilles (Kichey *et al.*, 2007) et contente les besoins azotés des grains en formation, limitant de ce fait l'appel d'azote exercé par les grains sur les feuilles. Ainsi, le maintien des métabolismes azoté et carboné est lié durant la phase post-floraison car le retard de sénescence engendré par l'absorption d'azote contribue à maintenir l'activité photosynthétique. Le contrôle de la sénescence influence grandement le rendement et la concentration en protéines des grains. Les variétés à sénescence retardée (de type « stay-green ») ont une durée de photosynthèse plus longue et donc un rendement élevé (Thomas and Howarth, 2000), tandis que celles qui présentent une sénescence précoce (allèles GPC-B1 par exemple) ont une bonne efficacité de remobilisation associée à une concentration en protéines forte (Uauy *et al.*, 2006).

V Antagonisme du rendement et de la concentration en protéines

Malgré les interactions positives des métabolismes azoté et carboné, des antagonismes dans les établissements respectifs de la concentration en protéines et du rendement existent. Ces antagonismes reposent sur la construction même du calcul de concentration en protéines, qui suppose qu'une augmentation de rendement est mécaniquement défavorable à la concentration en protéines dès lors que l'accumulation de protéines dans le grain n'est pas proportionnelle à celle d'amidon. L'absorption d'azote est un élément central de cet antagonisme, car l'azote, généralement limitant pour les cultures de blé, présente des effets différentiels sur la concentration en protéines et le rendement à la fois en fonction du stade d'absorption ainsi qu'au travers de son impact sur l'induction de la sénescence.

5.1. Relation négative entre concentration en protéines et rendement

L'amélioration simultanée du rendement et de la concentration en protéines est rendue complexe par la forte relation négative qui existe entre ces deux traits (Simmonds, 1995; Feil, 1997; Monaghan *et al.*, 2001; Triboi *et al.*, 2006; Oury and Godin, 2007; Bogard *et al.*, 2010), qui implique que de forts rendements sont en moyenne associés à des teneurs en protéines plus faibles (Figure 2-9 p.34). Le blé n'est pas un cas isolé, car cette relation négative est présente chez toutes les poacées (Simmonds, 1995), les protéagineux (Cober and Voldeng, 2000), et une problématique comparable est également présente chez les oléagineux pour la teneur en huile (Triboi and Triboi-Blondel, 2002).

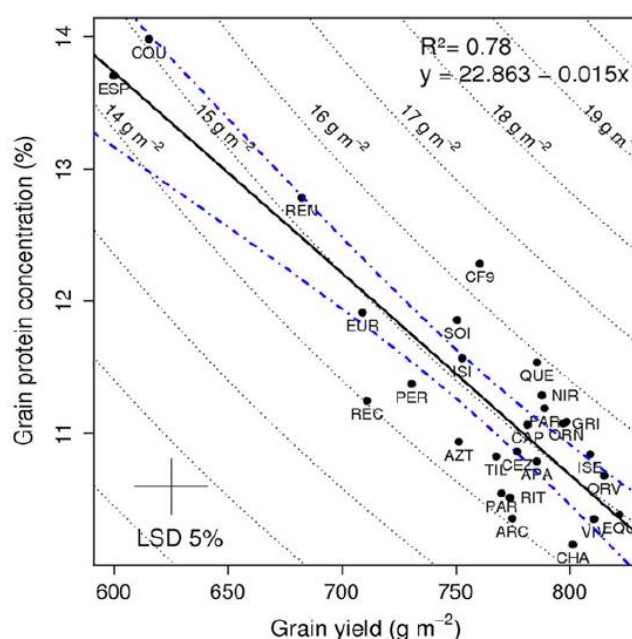


Figure 2-9 : Relation négative entre concentration en protéines et rendement basée sur 27 géotypes dans des essais multi-environnementaux (Bogard *et al.*, 2010).

5.1.1. Effets génétiques et environnement sur la relation négative

La relation négative entre la concentration en protéines et le rendement est complexe car elle est soumise à des effets génétiques et environnementaux forts ainsi que des interactions entre génotypes et environnements. En fonction des environnements, les coefficients de détermination de la relation s'échelonnant de 15 à 60% (Oury *et al.*, 2003). Selon Triboi *et al.* (2006), les facteurs environnementaux influencent principalement la relation négative au travers de leur effet sur le rendement : la relation se décale en faveur du rendement lors de conditions favorables à l'accumulation d'amidon (forte concentration en CO₂, fort rayonnement), tandis qu'elle se décale en faveur de la concentration en protéines lors de conditions défavorables à l'accumulation d'amidon (fortes températures, stress hydrique, rapport sources-puits affaibli à l'échelle du couvert) (Figure 2-10 p.35). Le seul paramètre environnemental susceptible d'affecter négativement le rendement et la concentration en protéines est la carence en azote, qui impacte le remplissage du grain en amidon et la disponibilité de l'azote pour la synthèse protéique (Figure 2-10 p.35). Au niveau génétique, l'indice de récolte amélioré par la sélection variétale (harvest index ; HI) favorise le rendement au détriment de la concentration en protéines.

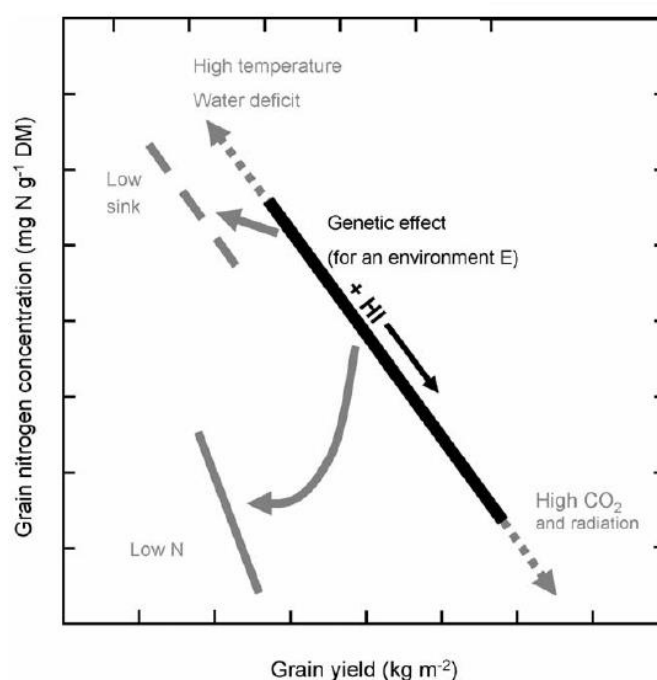


Figure 2-10 : Synthèse des effets environnementaux sur la relation négative concentration en protéines – rendement. La sélection variétale, au travers de l'augmentation de l'indice de récolte (HI), ainsi que les effets environnementaux de forte teneur en CO₂ et de fort rayonnement favorisent de forts rendements au détriment de la concentration en protéines. A l'inverse, les conditions de hautes températures, de déficit hydrique ou de modification du volume de puits sont favorables à la concentration en protéines au détriment du rendement. Une carence azotée est susceptible d'être défavorable à la fois au rendement et à la concentration en protéines (Triboi *et al.*, 2006).

5.1.2. Effets de la sélection sur la concentration en protéines

Selon certains auteurs, cette relation négative entre le rendement et la concentration en protéines est responsable des faibles teneurs en protéines actuelles des blés, car les efforts de sélection ont historiquement été focalisés sur le rendement. Plusieurs études soutenant cette hypothèse ont mis en évidence que les fortes augmentations de rendement réalisées au cours du 20^{ème} siècle ont été associées à une diminution de la concentration en protéines des grains (Le Buanec, 1999; Oury *et al.*, 2003; Triboi *et al.*, 2006; Amiri *et al.*, 2015). Une étude récente conduite en multi-local comprenant 225 génotypes élités européens inscrits entre 1969 et 2010 va cependant à l'encontre de ce constat, et montre que le progrès génétique a permis une augmentation de rendement de +0.45% par an sans impact significatif sur la concentration en protéines du fait d'une amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote et de l'indice de récolte de l'azote (Cormier *et al.*, 2013). Ces résultats reflètent la problématique à laquelle sont confrontés les sélectionneurs, qui est d'augmenter les rendements tout en maintenant la concentration en protéines à un seuil compatible avec les usages industriels.

Malgré les divergences entre auteurs quant au réel impact de l'augmentation des rendements sur la concentration en protéines, la relation négative entre ces deux traits constituera un obstacle majeur en amélioration variétale pour répondre à la fois aux attentes sociales en termes de volume de production et aux attentes qualitatives des industriels. Les pressions environnementales en faveur d'une réduction d'intrants rajoutent une part de complexité à cette problématique. L'étude réalisée par Cormier *et al.* (2013) montre qu'un régime de fertilisation azoté élevé (correspondant à des pratiques classiques en Europe occidentale) est nécessaire pour atteindre le seuil de 11% de protéines requis pour les usages de panification et d'export avec les génotypes actuels, et qu'un régime de fertilisation plus faible (100 kg N ha⁻¹ de moins) dépourvu d'apports tardifs conduit en moyenne à des teneurs en protéines inférieures à 9%. Ainsi, il apparaît nécessaire de comprendre les bases de la relation négative concentration en protéines – rendement afin de pouvoir la contourner, et parvenir à sélectionner des génotypes performants à la fois en termes de rendement et de concentration en protéines, si possible tolérant une dose d'azote réduite.

5.2. Bases physiologiques de la relation négative

La relation négative entre la teneur en protéine et le rendement est le fruit de l'interaction étroite existant entre les métabolismes azotés et carbonés. Deux grandes hypothèses ont été avancées quant à l'antagonisme entre accumulations d'amidon et de protéines dans le grain, sans toutefois que les déterminismes de ce phénomène soient encore bien compris.

5.2.1. Hypothèse de compétition énergétique des métabolismes azoté et carboné

La première hypothèse repose sur une compétition énergétique entre les métabolismes azotés et carbonés au cours du remplissage du grain. Le coût énergétique élevé de la synthèse protéique, qui nécessite 2,5 unités d'hydrates de carbone pour obtenir une unité de protéines (Simmonds, 1995), peut être un élément explicatif. Ainsi, lors du remplissage du grain,

l'énergie disponible serait nécessairement répartie entre la biosynthèse d'amidon et celle des protéines. La variabilité génétique quant à l'allocation énergétique vers l'une ou l'autre des voies de synthèse est une hypothèse plausible pour expliquer la relation négative concentration en protéines - rendement. Cette approche de compétition énergétique entre les métabolismes azotés et carbonés a également été avancée pour expliquer les différences de rendement et de concentration en protéines entre différentes espèces cultivées (Munier-Jolain and Salon, 2005). Dans ce cadre, il a été observé que les espèces à fort rendements associés à de faibles teneurs en protéines telles que le blé avaient des coûts énergétiques de synthèse d'amidon inférieurs à ceux observés chez d'autres espèces à rendements plus faibles et à teneurs en protéines plus élevées telles que le pois. Au-delà de l'aspect purement énergétique, la compétition entre les métabolismes azotés et carbonés pourrait également se situer à l'échelle d'un métabolite commun aux processus d'assimilation de l'azote et de respiration, l' α -cétylglutarate. Ce métabolite, impliqué dans l'intégration de l'azote dans des molécules carbonées est également un intermédiaire du cycle de Krebs, et pourrait mettre en compétition directe l'accumulation de métabolites azotés et la synthèse d'ATP nécessaire à l'agrégation en amidon des sucres issus de la photosynthèse.

5.2.2. Hypothèse de dilution des protéines dans l'amidon

La seconde hypothèse avancée pour expliquer la relation négative entre la concentration en protéines et le rendement est basée sur un effet de dilution des protéines dans l'amidon. Les différentes études qui soutiennent cette hypothèse divergent cependant quant aux mécanismes qui seraient susceptibles de gouverner ce phénomène.

Selon Acreche and Slafer (2009), l'effet de dilution des protéines dans l'amidon serait conséquent à l'augmentation du nombre de grains par mètre carré, qui est la principale composante de rendement améliorée par la sélection variétale. Ces auteurs soutiennent que l'augmentation du nombre de grains par mètre carré, qui a permis une augmentation du rendement et donc des puits d'amidon, a conduit à un partage de l'azote disponible entre des grains plus nombreux et a mécaniquement diminué leur concentration en protéines. Leur étude s'appuie largement sur les travaux de Martre *et al.* (2003), qui ont mis en évidence que l'accumulation d'amidon était principalement limitée par les puits (ici le volume de grains) tandis que l'accumulation de protéines était plus limitée par la source (autrement dit l'azote disponible pour les grains). D'après Acreche and Slafer (2009), la sélection aurait déséquilibré le rapport puits de carbone – source d'azote en faveur du rendement.

D'autres auteurs attribuent l'effet de dilution des protéines dans l'amidon à une variabilité de la durée de la phase de remplissage du grain en lien avec la sénescence foliaire (Pleijel *et al.*, 1999; Bogard *et al.*, 2011). Ces auteurs se basent principalement sur l'observation d'effets antagonistes de sénescences précoce ou tardives sur le rendement et la concentration en protéines des grains (Kibite and Evans, 1984). Les bases de cet antagonisme sont liées à une compétition pour l'azote foliaire entre le rendement, qui nécessite le maintien d'une activité de photosynthèse, et l'accumulation de protéines dans le grain qui nécessite la remobilisation de métabolites azotés en grande partie issus de la dégradation des protéines foliaires. Cette compétition est particulièrement marquée chez le blé dont 60 à 95% de l'azote du grain est

issu d'une remobilisation depuis les organes végétatifs (Cox *et al.*, 1986; Palta and Fillery, 1995; Kichey *et al.*, 2007). Ainsi, une sénescence tardive correspondant à une durée d'activité photosynthétique post-floraison longue conduit à une accumulation d'hydrates de carbone supérieure mais réduit l'efficacité de remobilisation de l'azote vers le grain (Gregersen *et al.*, 2008). A l'inverse, une sénescence foliaire précoce est associée à une activité photosynthétique post-floraison de courte durée, qui pénalise le rendement mais conduit à des teneurs en protéines élevées. Cependant, l'étude précise de ces mécanismes est complexe car la durée de photosynthèse post-floraison n'est pas uniquement sous contrôle génétique. Elle est soumise à de forts effets environnementaux, notamment la disponibilité en azote ainsi que la disponibilité en eau qui conditionne l'absorption d'azote. Si l'azote est disponible durant la phase post-floraison, la demande exercée sur les protéines foliaires pour l'accumulation de protéines dans le grain est moins forte et la sénescence est retardée. L'azote absorbé post-floraison bénéficie par ce biais à la fois au rendement et à la concentration en protéines. A l'inverse, une carence en azote augmente la pression de remobilisation exercée sur les protéines foliaires et précipite la sénescence des feuilles au détriment du rendement.

5.3. Principales stratégies pour augmenter la concentration en protéines

Différentes stratégies sont mises en place pour augmenter la concentration en protéines des grains sans pénaliser le rendement. Les principales reposent sur des approches agronomiques et génétiques.

5.3.1. Pilotage de la fertilisation

Actuellement, la principale stratégie mise en œuvre pour obtenir des teneurs en protéines élevées couplées à de forts niveaux de rendements repose sur un levier agronomique de fractionnement des apports d'azote. La dose d'azote à apporter, calculée par la méthode du bilan, est déterminée de manière à satisfaire les besoins de la culture en prenant en compte les fournitures du sol (reliquats et minéralisation). Cette dose d'azote totale est fractionnée en plusieurs apports, afin d'optimiser la coïncidence des stades de développement ayant des besoins azotés élevés avec la disponibilité de l'élément, tout en limitant les pertes par lessivage ou volatilisation. Jusqu'à récemment, la stratégie courante de fertilisation se limitait à deux apports. Le premier était réalisé en sortie d'hiver et le second à montaison. Les pratiques ont largement évolué ces dernières années avec la mise en place d'un système de bonifications/réfaction des lots sur la base de leur concentration en protéines par les organismes de collecte. La concentration en protéines est alors devenue un objectif fort pour les producteurs qui ont adopté un système de fertilisation fractionné en trois apports voire quatre apports (Figure 2-11 p.39).

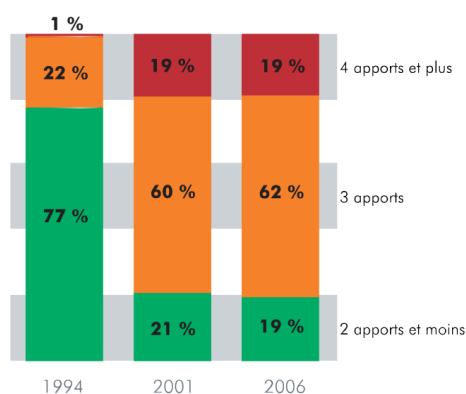


Figure 2-11 : Evolution des pratiques de fertilisation azotée des blés français de 1994 à 2006. Les valeurs proposées en gras représentent le pourcentage des surfaces de blés soumises à un fractionnement des apports d'azote en deux apports (bâtons verts), trois apports (bâtons orange) ou quatre apports (bâtons rouges) (Agreste, 2008).

Ainsi, deux à trois apports sont appliqués au cours de la phase végétative (épi 1 centimètre ; 1 à 2 nœuds) afin de favoriser le potentiel de rendement, et un dernier apport tardif positionné aux alentours du stade épiaison est appliqué pour favoriser la concentration en protéines du grain. Ce dernier apport n'influence que très peu le rendement mais permet une augmentation de la concentration en protéines du grain conséquente, du fait que l'absorption d'azote post-floraison soit plus favorable à la synthèse protéique qu'au rendement. En effet, bien que l'absorption d'azote durant la phase post-floraison ait tendance à augmenter la durée de vie des feuilles, et de ce fait d'optimiser le remplissage des grains en amidon, son effet est plus marqué sur la concentration en protéines du fait que leur accumulation soit principalement limité par la source (disponibilité de l'azote) contrairement au rendement qui est limité par le puits (volume de grains à remplir) en absence de stress (Martre *et al.*, 2003). Cette stratégie présente cependant des limites. D'une part, elle est fortement dépendante de la valorisation de ce dernier apport d'azote, et donc des conditions climatiques intervenant après floraison, mais elle est également consommatrice de fertilisants azotés qui sont à la fois de plus en plus onéreux et décriés pour leurs effets néfastes sur l'environnement.

5.3.2. Progrès génétique

Bien que les sélectionneurs exercent une sélection de routine pour la concentration en protéines des grains, la variation relativement limitée de ce caractère au sein des variétés élités pousse à aller chercher de la variabilité génétique dans du matériel exotique. De nombreuses études se sont penchées sur l'amélioration de la concentration en protéines des grains par le biais de facteurs génétiques, mais peu ont abouti à des résultats probants (reviewed in Shewry, 2009). Cela met en évidence la complexité de focaliser en sélection ce caractère à la fois intégratif et soumis à de fortes interactions génotype x environnement. Quelques exemples historiques couronnés de succès sont toutefois à noter, comme l'introgression de gènes issus

de matériels exotiques tels que Atlas 66 dans la variété commerciale Lancota (Johnson *et al.*, 1985), qui a permis un gain de concentration en protéines de 0,5 à 1,5% sans perte de rendement en comparaison à d'autres variétés de l'époque, ou encore l'introgession de gènes de la variété brésilienne Frandoso dans des programmes de sélection américains (Shewry, 2009).

5.3.2.1. QTL *Gpc-B1*

Actuellement, les travaux les plus prometteurs s'appuient sur le QTL *Gpc-B1* détecté sur le chromosome 6BS dans le cadre de l'étude d'une population recombinante de blé dur issue du croisement *Triticum turgidum ssp durum* et *Triticum turgidum ssp dicoccoides* (Joppa *et al.*, 1997). Le QTL *Gpc-B1* est gouverné par le gène *NAM-B1*, homologue du gène *NAM* (No Apical Meristem) d'*A. thaliana*, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que le développement, la réponse aux stress abiotiques, les signaux d'auxine, ainsi que la sénescence des feuilles (Guo and Gan, 2006). L'allèle fonctionnel de ce gène, présent chez des variétés de blés amidonniers israéliennes, accélère la sénescence foliaire de quatre à cinq jours et conduit à une augmentation de la concentration en protéines de 10 à 15% (Uauy *et al.*, 2006) du fait d'une meilleure efficacité de remobilisation de l'azote foliaire (Kade *et al.*, 2005).

Des gènes homéologues de *NAM-B1* chez le blé hexaploïde (*NAM-A1* ; *NAM-D1* ; *NAM-B2* et *NAM-D2*) sont également impliqués dans l'induction de la sénescence. Leur extinction par une approche d'ARN interférant (RNAi) conduit à un phénotype « stay-green » accusant un retard de dégradation de chlorophylle foliaire de 24 jours et une sénescence du pédoncule retardée de 30 jours (Uauy *et al.*, 2006). Une étude plus récente a mis en évidence l'effet redondant et additif des gènes situés aux loci *Gpc-A1* et *Gpc-D1* du blé hexaploïde sur la vitesse de sénescence foliaire (Avni *et al.*, 2014).

L'effet de l'allèle fonctionnel *Gpc-B1* a cependant fait débat du fait de son impact potentiellement négatif sur le rendement, qui n'a jusqu'à présent pas réellement été montré. Bien qu'un impact négatif ait été observé sur le PMG (Tabbitta *et al.*, 2013), la majorité des études mettent en évidence un effet positif sur la concentration en protéines sans effet significatif sur le rendement. En Argentine, l'introgession d'un allèle fonctionnel de *Gpc-B1* dans des lignées isogéniques de blé tendre a conduit à des augmentations de teneurs en protéines de 6,8%, ainsi qu'à une amélioration de l'indice azoté de récolte (N Harvest Index ; NHI) de 7,1% (Tabbitta *et al.*, 2013). Aux Etats-Unis, l'introgession d'un allèle fonctionnel *Gpc-B1* dans deux lignées a augmenté la concentration en protéines de +0.16% sans effet sur le rendement (Carter *et al.*, 2012). L'effet de *Gpc-B1* sur l'induction précoce de la sénescence foliaire pourrait cependant être limitant dans des contextes pédoclimatiques favorables à un maintien de végétation tardif, propices à de très forts niveaux de rendement.

5.3.2.2. Autres QTLs en lien avec le métabolisme azoté

D'autres QTLs prometteurs liés à la concentration en protéines du grain ont été découverts chez le blé. Par exemple, le QTL *Gpc.usw-A3*, positionné sur le chromosome 7A du blé dur, a été associé à une augmentation de concentration en protéines de +0,4 à +1% de la biomasse (Suprayogi *et al.*, 2009). Cette augmentation de la concentration en protéines intervient principalement sous l'effet de la remobilisation, bien que les lignées recombinantes possédant l'allèle favorable aient également absorbé significativement plus d'azote post-floraison (Suprayogi *et al.*, 2011). Toujours sur blé dur, Gadaleta *et al.* (2011) ont mis en évidence l'existence d'un QTL associé à la concentration en protéines des grains co-localisant avec des gènes codant pour la GS2. Sur blé tendre, plusieurs études ont mis en évidence l'importance des gènes codant pour les protéines de réserve dans le déterminisme génétique de la concentration en protéines. Ainsi, un QTL de concentration en protéines est associé au gène *Glu-B1-1* impliqué dans la synthèse de HMW-GS (Ravel *et al.*, 2006), et un autre QTL expliquant plus de 10% de la variation de concentration en protéines co-localise avec des gènes codant pour des gluténines et gliadines sur le chromosome 1B (Reif *et al.*, 2011). Ces approches dérivant de génétique d'association ciblant la concentration en protéines du grain semblent prometteuses et pourraient *à priori* permettre de participer à l'amélioration de la concentration en protéines du blé. Néanmoins l'impact au champ de telles introgressions sur le rendement en grain reste relativement mal évalué. Une approche complémentaire repose sur la recherche de déterminisme physiologique et génétique de variation de la teneur en protéine indépendante du rendement. C'est cette piste que nous allons explorer en étudiant la variabilité génétique existant autour de la relation négative rendement- concentration en protéines.

5.3.3. Déviation à la relation négative concentration en protéines - rendement

Malgré la robustesse de la relation négative entre la concentration en protéines et le rendement, son coefficient de détermination se situe en moyenne autour de 0,5-0,6 (Simmonds, 1995; Feil, 1997; Monaghan *et al.*, 2001; Triboi *et al.*, 2006; Oury and Godin, 2007; Bogard *et al.*, 2010). L'explication incomplète de la concentration en protéines par le niveau de rendement met en évidence l'existence d'une variabilité génétique non négligeable quant à la capacité à accumuler des protéines indépendamment du rendement. Cette variabilité génétique a été proposée par Monaghan *et al.* (2001) comme une alternative prometteuse pour la sélection de variétés à fortes teneurs associées à de forts rendements.

5.3.3.1. Le GPD ou « Grain protein deviation »

Afin d'être valorisable en sélection, la déviation apparente de certaines variétés à la relation négative entre concentration en protéines et rendement nécessitait d'être quantifiée. Dans ce cadre, le « grain protein deviation » (ou GPD) qui représente les résidus statistiques de la relation linéaire négative a été retenu (Monaghan *et al.*, 2001) (Figure 2-12 p.42). Par construction, la somme des GPD est nulle et 95% des valeurs de GPD sont comprises entre -1.96 et +1.96. Les interactions génotype x environnement étant susceptible d'influencer la

relation négative concentration en protéines – rendement, Oury and Godin (2007) ont mis en évidence que l'utilisation d'un panel de cinq lieux et deux années d'études étaient nécessaires pour atteindre une estimation correcte du GPD. De plus, ces auteurs ont proposé un algorithme permettant de limiter les biais induits par des hors-types (outliers) potentiels sur la régression concentration en protéines – rendement. Leurs travaux ont abouti en 2007 à l'attribution de bonifications à l'inscription au catalogue français par le CTPS pour les variétés présentant un GPD positif, afin d'encourager les sélectionneurs à présenter à l'inscription des variétés à fort potentiel protéique.

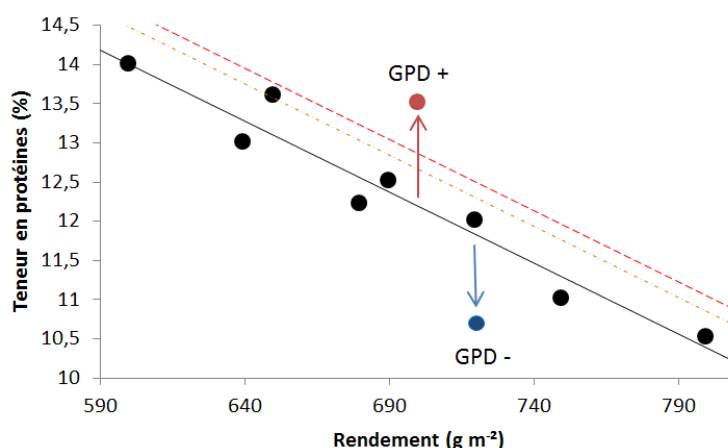


Figure 2-12 : Exemples de déviations positive et négative de certains génotypes à la relation négative moyenne entre concentration en protéines et rendement conduisant à la détermination de GPD positifs (GPD+) et de GPD négatifs (GPD-). Les régressions en pointillées rouges représentent les niveaux de GPD +0,5 et +0,7% qui correspondent aux seuils d'attribution respectifs des « simple » et « double » bonus GPD à l'inscription.

5.3.3.2. Bases physiologiques du GPD

Les bases physiologiques du GPD sont peu connues, mais sa nature laisse largement supposer que les variétés GPD positifs aient une capacité accrue à valoriser l'azote disponible en protéines. Cette meilleure valorisation de l'azote est susceptible d'intervenir aux niveaux de la remobilisation d'azote absorbé avant floraison ou de l'absorption d'azote après floraison, du fait que de la variabilité génétique ait été observée pour ces caractères (Cox *et al.*, 1986; Le Gouis *et al.*, 2000; Kichey *et al.*, 2007). Plusieurs études ont cependant mis en évidence que l'absorption d'azote après floraison était une piste privilégiée pour expliquer le GPD (Monaghan *et al.*, 2001; Bogard *et al.*, 2010; Martre *et al.*, 2015). Sur la base d'une étude multi-locale et pluriannuelle comprenant 27 génotypes, Bogard *et al.* (2010) ont montré que le GPD était fortement corrélé à la capacité des variétés à absorber l'azote après floraison indépendamment de l'azote absorbé à floraison. Plus précisément, le GPD était fortement corrélé ($r^2=0.64$) aux résidus de la relation entre quantité d'azote absorbé à floraison et

quantité d'azote absorbé après floraison. Ce constat tend à mettre en évidence que le GPD est associé à de la variabilité pour la satiété en azote et que le caractère qui semble expliquer les niveaux élevés de valorisation de l'azote des GPD positifs soit une capacité accrue à réaliser une absorption « de luxe » au cours du remplissage du grain. Dans ce sens, les nœuds potentiels de variabilité génétique associée au GPD peuvent hypothétiquement intervenir à différents niveaux, allant d'une variabilité intrinsèque du seuil de satiété entre génotypes, à des variations de réponse à un niveau de satiété donné. Ces variations de réponses pourraient quant à elles intervenir au niveau de l'intensité du signal circulant, ou encore au travers d'un effet quantitatif du signal de répression sur l'expression ou l'activité des transporteurs racinaires de nitrate. Les différents nœuds de variabilité génétique potentiellement associés au GPD sont présentés en Figure 2-13 p.43.

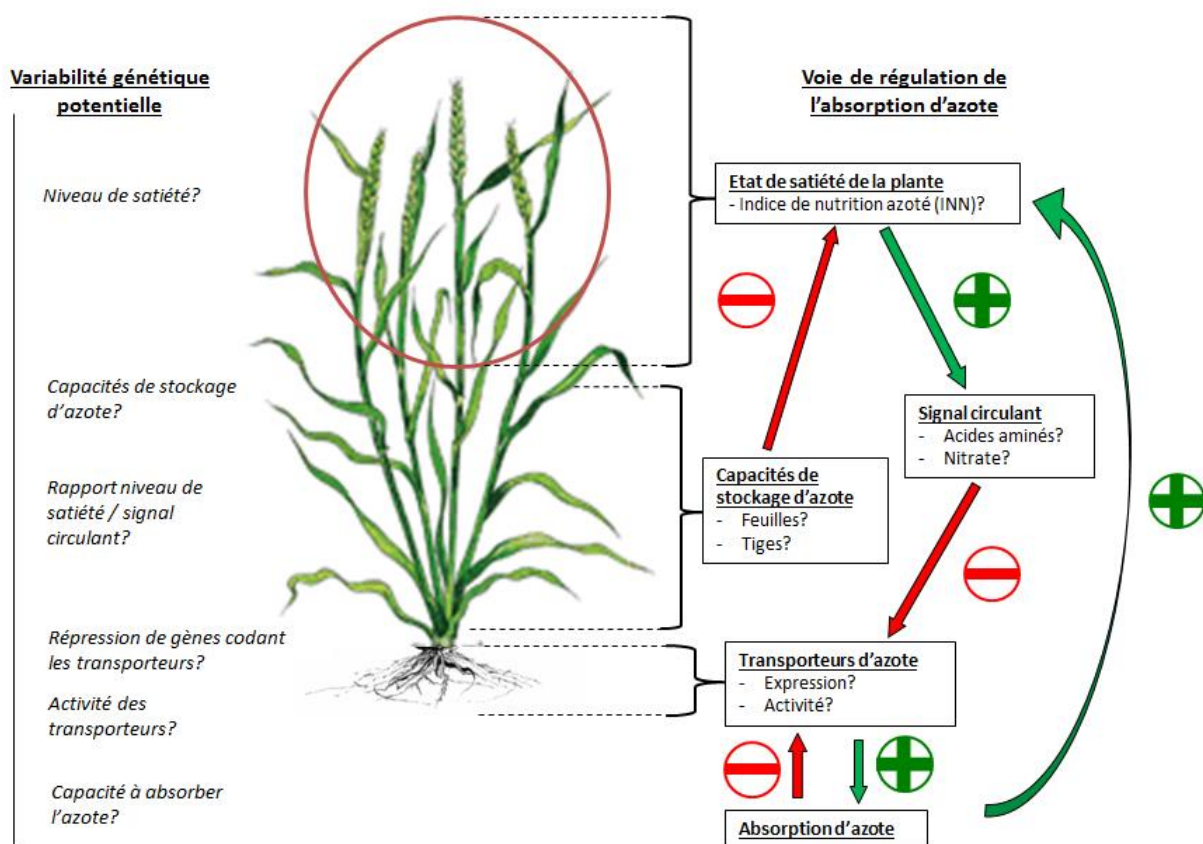


Figure 2-13 : Synthèse des nœuds de variabilité génétique potentiels associés aux principaux facteurs de régulation de l'absorption d'azote et susceptibles d'être impliqués dans le déterminisme du GPD. La variabilité d'absorption post-floraison liée au GPD est dépendante du niveau de satiété. Cette variabilité peut hypothétiquement être induite par des nœuds de variabilité situés au niveau des différents facteurs intervenant dans la réponse d'absorption d'azote au signal de satiété.

5.3.3.3. *Notion de satiété en azote*

La satiété en azote peut être définie comme la capacité maximale d'accumulation d'azote à l'échelle du couvert, correspondant au point de saturation en azote des tissus décrit par la courbe de teneur en azote maximum proposée par Justes *et al.* (1994). La capacité du couvert à stocker de l'azote pourrait être un déterminant des niveaux d'absorption, et influencer par ce biais la concentration en protéines et le GPD. L'hypothèse d'une influence des capacités de stockage d'azote sur les niveaux d'absorption post-floraison a été dans un premier temps avancée par Martre *et al.* (2006) dans le cadre du développement d'un modèle de simulation de l'accumulation de l'azote du grain. Selon ces auteurs, la quantité d'azote absorbée après floraison serait dépendante des capacités de stockage d'azote dans les tiges. Très récemment, Martre *et al.* (2015) ont réalisé une étude basée sur des simulations du modèle SiriusQuality2 paramétré avec 40 années d'archives de données climatiques sur trois lieux avec deux doses d'azote. Ces auteurs ont observé l'effet de 75 paramètres physiologiques sur la concentration en protéines des grains, le rendement et le GPD. Les principales conclusions de cette étude sont que la capacité de stockage de l'azote dans les feuilles et dans les tiges semble être un déterminisme physiologique robuste du GPD. Dans la plupart des cas, les GPD positifs étaient également associés à des niveaux d'absorption d'azote post-floraison supérieurs comme l'ont mis en évidence Bogard *et al.* (2010). Ces études suggèrent que des différences génétiques de niveaux de satiété induites par des capacités de stockage variables soient à l'origine des différences d'absorption d'azote post-floraison associées au GPD. Une compréhension plus précise de l'impact du statut azoté à floraison sur l'absorption d'azote post-floraison pourrait ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes reliant satiété en azote et GPD.

VI Objectifs de la thèse et stratégie de recherche

Comme nous l'avons vu précédemment, la concentration en protéines est complexe à améliorer du fait de la forte relation négative existant entre concentration en protéines et rendement (Simmonds, 1995; Feil, 1997; Monaghan *et al.*, 2001; Triboui *et al.*, 2006; Oury and Godin, 2007). Une sélection génétique basée sur le GPD est susceptible de permettre l'amélioration de la concentration en protéines sans impacter négativement le rendement (Monaghan *et al.*, 2001; Oury *et al.*, 2003; Oury and Godin, 2007), mais passe nécessairement par la détermination de marqueurs physiologiques ou moléculaires simples à évaluer et robustement associés à ce trait. Des travaux précédemment réalisés au sein de l'équipe ont mis en évidence que le GPD était fortement corrélé à la capacité des génotypes à absorber de l'azote après floraison indépendamment du statut azoté à floraison (Bogard *et al.*, 2010), suggérant que la régulation de l'absorption post-floraison par la satiété en azote soit sous contrôle génétique et associée au GPD. Ce postulat représente le point de départ de cette thèse, dont l'enjeu finalisé est de déterminer des marqueurs simples à mesurer et robustement associés au GPD pour aider la sélection. Dans le temps imparti, l'objectif de la thèse était plus précisément d'identifier les déterminants écophysiologiques et génétiques de l'absorption de l'azote post-floraison, qui représentent des marqueurs potentiels. Pour cela une stratégie en trois étapes a été déployée.

La première étape avait pour but d'apporter une vision claire de l'effet du statut azoté à floraison sur la dynamique d'absorption d'azote post-floraison en conditions contrôlées non limitantes pour l'azote. Cet axe de recherche intègre également le suivi en cinétique de paramètres physiologiques et moléculaires au cours de la phase post-floraison, qui peuvent permettre d'une part de mieux comprendre les profils d'absorption observés, et d'autre part de prédéterminer des nœuds de variabilité potentiels de l'absorption d'azote. L'étude mise en œuvre pour répondre à ces questions fait l'objet du chapitre 4.

La deuxième étape avait pour but de caractériser les dynamiques d'absorption d'azote post-floraison en fonction du statut azoté à floraison chez deux génotypes robustement contrastés pour le GPD. Cette caractérisation implique également le suivi de traits physiologiques et moléculaires au cours de la phase post-floraison. Ce type d'approche devait permettre d'améliorer les connaissances fondamentales des dynamiques et des régulations de l'absorption d'azote, mais surtout de déterminer des traits physiologiques et/ou moléculaires associés à la variabilité génétique pour le GPD. L'étude réalisée en conditions contrôlées pour répondre à ces questions fait l'objet du chapitre 5.

La troisième étape avait pour but d'évaluer dans des conditions de culture au champ la pertinence des marqueurs du GPD proposés en conditions contrôlées. Cet axe de recherche implique également, mais dans une moindre mesure, une validation des mécanismes de régulation de l'absorption d'azote proposés en conditions contrôlées. L'étude conduite au champ pour répondre à ces questions fait l'objet du chapitre 6.

En amont de ces trois chapitres, un complément informatif des matériels et méthodes mis en œuvre dans ces travaux de thèse est proposé. Ce chapitre s'attache à présenter certains

aspects méthodologiques qui ne sont à mon sens pas suffisamment détaillés dans les sections de matériels et méthodes des articles.

Références

- Abbate PE, Andrade FH, Culot JP.** 1995. The effects of radiation and nitrogen on number of grains in wheat. *The Journal of Agricultural Science* **124**, 351.
- Acreche MM, Slafer GA.** 2009. Variation of grain nitrogen content in relation with grain yield in old and modern Spanish wheats grown under a wide range of agronomic conditions in a Mediterranean region. *The Journal of Agricultural Science* **147**, 657.
- AGPB.** 2014. Monde - Données globales et par pays sur le marché des céréales. <http://www.agpb.com/>
- Agreste.** 2008. Enquête pratiques culturales en 2006. *Agreste Informations* **124**.
- Agreste.** 2014. Mars 2014 : redressement des cours céréaliers et oléagineux. *Agreste Synthèses* **236**.
- Alley MM, Scharf P, Brann DE, Baethgen WE, Hammons JL.** 1999. Nitrogen management for winter wheat: principles and recommendations. *Crop and Soil Environmental science*, 424-429.
- Almagro A, Lin SH, Tsay YF.** 2008. Characterization of the Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development. *The Plant Cell Online* **20**, 3289–3299.
- Almasri MN, Kaluarachchi JJ.** 2004. Assessment and management of long-term nitrate pollution of ground water in agriculture-dominated watersheds. *Journal of Hydrology* **295**, 225–245.
- Altenbach SB, DuPont FM, Kothari KM, Chan R, Johnson EL, Lieu D.** 2003. Temperature, Water and Fertilizer Influence the Timing of Key Events During Grain Development in a US Spring Wheat. *Journal of Cereal Science* **37**, 9–20.
- Amiri R, Bahraminejad S, Sasani S, Jalali-Honarmand S, Fakhri R.** 2015. Bread wheat genetic variation for grain's protein, iron and zinc concentrations as uptake by their genetic ability. *European Journal of Agronomy* **67**, 20–26.
- Anderson OD, Litts JC, Greene FC.** 1997. The α -gliadin gene family. I. Characterization of ten new wheat α -gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and southern analysis of the gene family. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 50–58.
- Avni R, Zhao R, Pearce S, Jun Y, Uauy C, Tabbita F, Fahima T, Slade A, Dubcovsky J, Distelfeld A.** 2014. Functional characterization of GPC-1 genes in hexaploid wheat. *Planta* **239**, 313–324.
- Barak S, Mudgil D, Khatkar BS.** 2013. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology* **51**, 211–217.
- Bernard SM, Møller ALB, Dionisio G, et al.** 2008. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology* **67**, 89–105.
- Bertheloot J.** 2009. Nitrogen distribution within wheat plants (*Triticum aestivum* L.) after flowering: a dynamic model based on a functional-structural approach. Doctoral dissertation, AgroParisTech.
- Bertheloot J, Martre P, Andrieu B.** 2008. Dynamics of light and nitrogen distribution during grain filling within wheat canopy. *Plant physiology* **148**, 1707–1720.
- Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J-M, Jeuffroy M-H, Gate P, Martre P, Le Gouis J.** 2010. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4303–4312.
- Bogard M, Jourdan M, Allard V, et al.** 2011. Anthesis date mainly explained correlations between post-anthesis leaf senescence, grain yield, and grain protein concentration in a winter wheat population segregating for flowering time QTLs. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3621–3636.
- Boisson M, Mondon K, Torney V, et al.** 2005. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **110**, 932–940.
- Bolot S, Abrouk M, Masood-Quraishi U, Stein N, Messing J, Feuillet C, Salse J.** 2009. The ‘inner circle’ of the cereal genomes. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 119–125.
- Bonafede MD, Tranquilli G, Pflüger LA, Peña RJ, Dubcovsky J.** 2015. Effect of allelic variation at the Glu-3/Gli-1 loci on breadmaking quality parameters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science* **62**, 143–150.

- Branlard G, Dardevet M, Amiour N, Igrejas G.** 2003. Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* **50**, 669–679.
- Branlard G, Dardevet M, Saccomano R, Lagoutte F, Gourdon J.** 2001. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. Wheat in a global environment. *Springer Netherlands*, 157–169.
- Brisson N, Gate P, Gouache D, Charmet G, Oury F-X, Huard F.** 2010. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* **119**, 201–212.
- Brocklehurst PA.** 1977. Factors controlling grain weight in wheat. *Nature* **266**, 348–349.
- Buchner P, Hawkesford MJ.** 2014. Complex phylogeny and gene expression patterns of members of the NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family (NPF) in wheat. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5697–5710.
- Bustos DV, Hasan AK, Reynolds MP, Calderini DF.** 2013. Combining high grain number and weight through a DH-population to improve grain yield potential of wheat in high-yielding environments. *Field Crops Research* **145**, 106–115.
- Carter AH, Santra DK, Kidwell KK.** 2012. Assessment of the effects of the Gpc-B1 allele on senescence rate, grain protein concentration and mineral content in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.) from the Pacific Northwest Region of the USA: Assessment of Gpc-B1 in the Pacific Northwest. *Plant Breeding* **131**, 62–68.
- Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Muñoz S, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 2001. Major alterations of the regulation of root NO₃[–] uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. *Plant Physiology* **127**, 262–271.
- Champigny ML.** 1995. Utilisation de l'isotope lourd ¹⁵N et de la spectrométrie d'émission pour l'étude de l'absorption et de l'assimilation des nitrates par les feuilles et racines de Blé. Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes. *Colloques-INRA* **70**, 197–206.
- Chiu C-C, Lin C-S, Hsia A-P, Su R-C, Lin H-L, Tsay Y-F.** 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1.4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1139–1148.
- Chopin F, Orsel M, Dorbe M-F, Chardon F, Truong H-N, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2007. The Arabidopsis ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *The Plant Cell Online* **19**, 1590–1602.
- Choulet F, Alberti A, Theil S, et al.** 2014. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* **345**, 1249721–1249721.
- Cober ER, D Voldeng H.** 2000. Developing high-protein, high-yield soybean populations and lines. *Crop Science* **40**, 39–42.
- Cormier F, Faure S, Dubreuil P, Heumez E, Beauchêne K, Lafarge S, Praud S, Le Gouis J.** 2013. A multi-environmental study of recent breeding progress on nitrogen use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **126**, 3035–3048.
- Cox MC, Qualset CO, Rains DW.** 1986. Genetic variation for nitrogen assimilation and translocation in wheat. III. Nitrogen translocation in relation to grain yield and protein. *Crop Science* **26**, 737–740.
- Delgado E, Mitchell RAC, Parry MAJ, Driscoll SP, Mitchell VJ, Lawlor DW.** 1994. Interacting effects of CO₂ concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat leaves. *Plant, Cell & Environment* **17**, 1205–1213.
- Delwiche SR.** 1998. Protein content of single kernels of wheat by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Cereal Science* **27**, 241–254.
- Diaz C, Lemaitre T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C.** Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. *Plant physiology* **147**, 1437–1449.
- Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J.** 2009. Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 178–184.

- D'Ovidio R, Masci S.** 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* **39**, 321–339.
- Don C, Mann G, Bekes F, Hamer RJ.** 2006. HMW-GS affect the properties of glutenin particles in GMP and thus flour quality. *Journal of Cereal Science* **44**, 127–136.
- Dubcovsky J, Dvorak J.** 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* **316**, 1862–1866.
- Dupont FM, Altenbach SB.** 2003. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science* **38**, 133–146.
- Dupont FM, Hurkman WJ, Vensel WH, Tanaka C, Kothari KM, Chung OK, Altenbach SB.** 2006. Protein accumulation and composition in wheat grains: Effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy* **25**, 96–107.
- Evans JR.** 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* **78**, 9–19.
- Evans JR.** 2013. Improved photosynthetic efficiency is necessary to increase potential crop yield. Applying photosynthesis research to improvement of food crops. *ACIAR Proceedings* **140**, 27–34.
- FAO.** 2015. Bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de céréales. <http://www.fao.org/>
- FAOSTAT.** 2015. <http://faostat.fao.org/>.
- Feil B.** 1997. The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends in Agronomy* **1**, 103–119.
- Feillet P.** 2000. Le grain de blé: composition et utilisation. *Editions Quae*.
- Filleur S, Dorbe M-F, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F.** 2001. An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS letters* **489**, 220–224.
- Fischer RA.** 1985. Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *The Journal of Agricultural Science* **105**, 447.
- Forster P, Ramaswamy V, Artaxo P, et al.** 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forces. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Editions Solomon S et al (Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York), 747–845.
- FranceAgriMer.** 2011. Marché mondial du blé : Les causes d'une instabilité croissante. *Les études de FranceAgriMer*.
- FranceAgriMer.** 2014. Qualité des blés français à l'entrée des silos de collecte. <http://www.franceagrimer.fr/>
- Gadaleta A, Nigro D, Giancaspro A, Blanco A.** 2011. The glutamine synthetase (GS2) genes in relation to grain protein content of durum wheat. *Functional & Integrative Genomics* **11**, 665–670.
- GEVES.** 2015. Céréales à paille : Nouvelles variétés proposées à l'inscription sur la liste A du catalogue officiel français. <http://www.geves.fr/>
- Girin T, Lejay L, Wirth J, Widiez T, Palenchar PM, Nazoa P, Touraine B, Gojon A, Lepetit M.** 2007. Identification of a 150bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1366–1380.
- Glass ADM.** 2009. Nitrate uptake by plant roots. *Botany* **87**, 659–667.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C.** 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* **327**, 812–818.
- Goglio P, Colnenne-David C, Di Bene C, et al.** 2012. Soil, climate and cropping system effects on N2O accounting in the LCA of faba bean and cereals. Proceedings of the 8th International Conference on Life Cycle Assessment in the Agri-Food Sector (LCA Food 2012), 1–4.
- Gojon A, Nacry P, Davidian J-C.** 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 328–338.
- Gooding MJ, Gregory PJ, Ford KE, Ruske RE.** 2007. Recovery of nitrogen from different sources following applications to winter wheat at and after anthesis. *Field Crops Research* **100**, 143–154.
- Graybosch RA, Peterson CJ, Shelton DR, Baenziger PS.** 1996. Genotypic and environmental modification of wheat flour protein composition in relation to end-use quality. *Crop Science* **36**, 296–300.

- Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K.** 2008. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* **10**, 37–49.
- Gu Y, Crossman C, Kong X, Luo M, You F, Coleman-Derr D, Dubcovsky J, Anderson O.** 2004. Genomic organization of the complex gliadin gene loci in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **109**.
- Guo Y, Gan S.** 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* **46**, 601–612.
- Guo F-Q, Wang R, Chen M, Crawford NM.** 2001. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1. 1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant Cell Online* **13**, 1761–1777.
- Hawkesford MJ, Araus J-L, Park R, Calderini D, Miralles D, Shen T, Zhang J, Parry MAJ.** 2013. Prospects of doubling global wheat yields. *Food and Energy Security* **2**, 34–48.
- Huang N-C, Liu K-H, Lo H-J, Tsay Y-F.** 1999. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell Online* **11**, 1381–1392.
- Hurkman WJ, McCue KF, Altenbach SB, et al.** 2003. Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm. *Plant Science* **164**, 873–881.
- INSEE.** 2015. <http://www.bdm.insee.fr/>
- Ishida H, Yoshimoto K.** 2008. Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy* **4**, 961–962.
- Jeuffroy MH, Oury FX.** 2012. Impact des nouvelles techniques de production, impliquant de faibles niveaux d'intrants, sur la quantité de protéines du blé. *Innovations Agronomiques* **19**, 13–25.
- Johansson E, Malik AH, Hussain A, Rasheed F, Newson WR, Plivelic T, Hedenqvist MS, Gällstedt M, Kuktaite R.** 2013. Wheat gluten polymer structures: The impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. *Cereal Chemistry* **90**, 367–376.
- Johansson E, Prieto-Linde ML, Jönsson JÖ.** 2001. Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. *Cereal Chemistry* **78**, 19–25.
- Johnson VA, Mattern PJ, Peterson CJ, Kuhr SL.** 1985. Improvement of wheat protein by traditional breeding and genetic techniques. *Cereal Chemistry* **62**, 350–355.
- Joppa LR, Du C, Hart GE, Hareland GA.** 1997. Mapping gene (s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Science* **37**, 1586–1589.
- Justes E, Mary B, Meynard JM, Machet JM, Thelier-Huche L.** 1994. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* **74**, 397–407.
- Kade M, Barneix AJ, Olmos S, Dubcovsky J.** 2005. Nitrogen uptake and remobilization in tetraploid 'Langdon' durum wheat and a recombinant substitution line with the high grain protein gene Gpc-B1. *Plant Breeding* **124**, 343–349.
- Kibite S, Evans LE.** 1984. Causes of negative correlations between grain yield and grain protein concentration in common wheat. *Euphytica* **33**, 801–810.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J.** 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* **102**, 22–32.
- King BJ, Siddiqi MY, Ruth TJ, Warner RL, Glass AD.** 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiology* **102**, 1279–1286.
- Kirkman MA, Mifflin BJ.** 1979. The nitrate content and amino acid composition of the xylem fluid of spring wheat throughout the growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **30**, 653–660.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K.** 2010. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* **18**, 927–937.

- Krouk G, Tillard P, Gojon A.** 2006. Regulation of the high-affinity NO₃- uptake system by NRT1.1-mediated NO₃- demand signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **142**, 1075–1086.
- Laperche A, Devienne-Barret F, Maury O, Le Gouis J, Ney B.** 2006. A simplified conceptual model of carbon/nitrogen functioning for QTL analysis of winter wheat adaptation to nitrogen deficiency. *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 1131–1146.
- Le Buanec B.** 1999. Diversité génétique des variétés de blé tendre cultivées en France au cours du vingtième siècle. Evolution variétale, données techniques et économiques. *Comptes rendus de l'académie d'agriculture française* **85**, 37-53.
- Le Gouis J, Béghin D, Heumez E, Pluchard P.** 2000. Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy* **12**, 163–173.
- Le Gouis J, Oury FX, Lorgeou J, Senellart P.** 2014. Plus de protéines grâce à la génétique aujourd'hui et demain ? *Colloque blé tendre – Produire des protéines pour tous les débouchés, mardi 13 mai 2014 – Paris (France)*.
- Lejay L, Wirth J, Pervent M, Cross JM-F, Tillard P, Gojon A.** 2008. Oxidative Pentose Phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology* **146**, 2036–2053.
- Lemaitre T, Gauffichon L, Boutet-Mercey S, Christ A, Masclaux-Daubresse C.** 2008. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in Arabidopsis thaliana Wassileskija accession. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1056–1065.
- Lersten NR.** 1987. Morphology and anatomy of the wheat plant. *Wheat and Wheat Improvement*, 33–75.
- Li J-Y, Fu Y-L, Pike SM, et al.** 2010. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *The Plant Cell Online* **22**, 1633–1646.
- Lillo C.** 2008. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal* **415**, 11.
- Lin S-H, Kuo H-F, Canivenc G, et al.** 2008. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell Online* **20**, 2514–2528.
- Liu K-H, Tsay Y-F.** 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal* **22**, 1005–1013.
- Maathuis FJ.** 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 250–258.
- Makino A.** 2011. Photosynthesis, grain yield, and nitrogen utilization in rice and wheat. *Plant Physiology* **155**, 125–129.
- Makino A, Mae T, Ohira K.** 1988. Differences between wheat and rice in the enzymic properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* **174**, 30–38.
- Makowski D, Wallach D, Meynard J-M.** 1999. Models of yield, grain protein, and residual mineral nitrogen responses to applied nitrogen for winter wheat. *Agronomy Journal* **91**, 377–385.
- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A.** 2005. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **95**, 853–861.
- Malamy JE, Ryan KS.** 2001. Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **127**, 899–909.
- Marcussen T, Sandve SR, Heier L, et al.** 2014. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* **345**, 1250092–1250092.
- Martínez DE, Costa ML, Guamet JJ.** 2008. Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology* **10**, 15–22.
- Martre P, He J, Le Gouis J, Semenov MA.** 2015. In silico system analysis of physiological traits determining grain yield and protein concentration for wheat as influenced by climate and crop management. *Journal of Experimental Botany*, erv049.

- Martre P, Jamieson PD, Semenov MA, Zyskowski RF, Porter JR, Tribol E.** 2006. Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 138–154.
- Martre P, Porter JR, Jamieson PD, Tribol E.** 2003. Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology* **133**, 1959–1967.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- Méléard B.** 2014. Le rôle des protéines en panification. Colloque blé tendre – Produire des protéines pour tous les débouchés, mardi 13 mai 2014 – Paris (France).
- Miller AJ, Cramer MD.** 2005. Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. *Plant and Soil* **274**, 1–36.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Moeller C, Evers JB, Rebetzke G.** 2014. Canopy architectural and physiological characterization of near-isogenic wheat lines differing in the tiller inhibition gene tin. *Frontiers in Plant Science* **5**, 617.
- Monaghan JM, Snape JW, Chojecki AJS, Kettlewell PS.** 2001. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica* **122**, 309–317.
- Morris CF.** 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant molecular biology* **48**, 633–647.
- Mounier E, Pervent M, Ljung K, Gojon A, Nacry P.** 2014. Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of Arabidopsis root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability: Nitrate signalling by NRT1.1. *Plant, Cell & Environment* **37**, 162–174.
- Munier-Jolain NG, Salon C.** 2005. Are the carbon costs of seed production related to the quantitative and qualitative performance? An appraisal for legumes and other crops. *Plant, Cell & Environment* **28**, 1388–1395.
- Munos S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A.** 2004. Transcript profiling in the chl1-5 Mutant of Arabidopsis reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *The Plant Cell Online* **16**, 2433–2447.
- Nadaud I, Girousse C, Debiton C, Chambon C, Bouzidi MF, Martre P, Branlard G.** 2010. Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. *Proteomics* **10**, 2901–2910.
- Naeem HA, Paulon D, Irmak S, MacRitchie F.** 2012. Developmental and environmental effects on the assembly of glutenin polymers and the impact on grain quality of wheat. *Journal of Cereal Science* **56**, 51–57.
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass AD, Touraine B.** 2003. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2. 1 in Arabidopsis thaliana: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant molecular biology* **52**, 689–703.
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD.** 2003. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of Arabidopsis thaliana: responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology* **44**, 304–317.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ.** 2006. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiology* **142**, 1304–1317.
- Osborne TB.** 1907. The proteins of the wheat kernel. Carnegie institution of Washington **84**.
- Oscarson P, Lundborg T, Larsson CM.** 1995a. Genotypic differences in nitrate uptake and nitrogen utilization for spring wheat grown hydroponically. *Crop Science* **35**, 1056–1062.
- Oscarson P, Lundborg T, Larsson M, Larsson C-M.** 1995b. Fate and effects on yield components of extra applications of nitrogen on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in solution culture. *Plant and Soil* **175**, 179–188.

- Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Pluchard P, Rousset M, Galic N.** 2003. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program [*Triticum aestivum* L.]. *Journal of Genetics and Breeding* **57**, 59–68.
- Oury F-X, Godin C.** 2007. Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica* **157**, 45–57.
- Palta JA, Fillery IRP.** 1995. N application enhances remobilization and reduces losses of pre-anthesis N in wheat grown on a duplex soil. *Australian Journal of Agricultural Research* **46**, 519–531.
- Pauly A, Pareyt B, Fierens E, Delcour JA.** 2013. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) kernel hardness: I. Current view on the role of puroindolines and polar lipids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**, 413–426.
- Payne PI.** 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annual Review of Plant Physiology* **38**, 141–153.
- Payne PI, Holt LM, Lawrence GJ, Law CN.** 1982. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm. *Plant Foods for Human Nutrition* **31**, 229–241.
- Pleijel H, Mortensen L, Fuhrer J, Ojanperä K, Danielsson H.** 1999. Grain protein accumulation in relation to grain yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in open-top chambers with different concentrations of ozone, carbon dioxide and water availability. *Agriculture, ecosystems & environment* **72**, 265–270.
- Plessis A, Ravel C, Bordes J, Balfourier F, Martre P.** 2013. Association study of wheat grain protein composition reveals that gliadin and glutenin composition are trans-regulated by different chromosome regions. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3627–3644.
- Quraishi UM, Abrouk M, Murat F, et al.** 2011. Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-metaQTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution: concerted genome evolution of a NUE metaQTL in cereals. *The Plant Journal* **65**, 745–756.
- Ravel C, Praud S, Murigneux A, Linossier L, Dardevet M, Balfourier F, Dufour P, Brunel D, Charmet G.** 2006. Identification of Glu-B1-1 as a candidate gene for the quantity of high-molecular-weight glutenin in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by means of an association study. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 738–743.
- Reif JC, Gowda M, Maurer HP, Longin CFH, Korzun V, Ebmeyer E, Bothe R, Pietsch C, Würschum T.** 2011. Association mapping for quality traits in soft winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **122**, 961–970.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A.** 2006. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19206–19211.
- Robertson GP, Groffman PM.** 2007. Nitrogen transformations. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 341–364.
- Ruffel S, Gojon A, Lejay L.** 2014. Signal interactions in the regulation of root nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5509–5517.
- Saint Pierre C, Peterson CJ, Ross AS, Ohm JB, Verhoeven MC, Larson M, Hoefer B.** 2008. Winter wheat genotypes under different levels of nitrogen and water stress: Changes in grain protein composition. *Journal of Cereal Science* **47**, 407–416.
- Schnyder H, Baum U.** 1992. Growth of the grain of wheat (*Triticum aestivum* L.). The relationship between water content and dry matter accumulation. *European Journal of Agronomy* **1**, 51–57.
- Setter TL, Carlton G.** 2000. Germination, vegetative and reproductive growth. The wheat book: Principles and practice. *Editions Anderson WK, Garlinge JR*, 37–54.
- Shewry PR.** 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1537–1553.
- Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS.** 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **357**, 133–142.
- Shewry PR, Halford NG, Lafiandra D.** 2003. Genetics of wheat gluten proteins. *Advances in genetics* **49**, 111–184.

- Shewry PR, Halford NG, Tatham AS.** 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science* **15**, 105–120.
- Shewry PR, Mitchell RAC, Tosi P, Wan Y, Underwood C, Lovegrove A, Freeman J, Toole GA, Mills ENC, Ward JL.** 2012. An integrated study of grain development of wheat (cv. Hereward). *Journal of Cereal Science* **56**, 21–30.
- Siddiqi MY, Glass AD, Ruth TJ, Rufty TW.** 1990. Studies of the uptake of nitrate in barley I. kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. *Plant Physiology* **93**, 1426–1432.
- Simmonds NW.** 1995. The relation between yield and protein in cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **67**, 309–315.
- Sinclair TR, Jamieson PD.** 2006. Grain number, wheat yield, and bottling beer: An analysis. *Field Crops Research* **98**, 60–67.
- Singh NK, Shepherd KW.** 1988. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **75**, 628–641.
- Slafer GA, Andrade FH.** 1993. Physiological attributes related to the generation of grain yield in bread wheat cultivars released at different eras. *Field Crops Research* **31**, 351–367.
- Smith VH, Schindler DW.** 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 201–207.
- Smith MS, Zimmerman K.** 1981. Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. *Soil Science Society of America Journal* **45**, 865–871.
- Snape JW, Hyne V, Aitken K.** 1993. Targeting genes in wheat using marker-mediated approaches. *Proceedings of the Eighth International Wheat Genetics Symposium* **2**, 749–759.
- Sosulski FW, Imafidon GI.** 1990. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 1351–1356.
- Suprayogi Y, Clarke JM, Bueckert R, Clarke FR, Pozniak CJ.** 2011. Nitrogen remobilization and post-anthesis nitrogen uptake in relation to elevated grain protein concentration in durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science* **91**, 273–282.
- Suprayogi Y, Pozniak CJ, Clarke FR, Clarke JM, Knox RE, Singh AK.** 2009. Identification and validation of quantitative trait loci for grain protein concentration in adapted Canadian durum wheat populations. *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 437–448.
- Tabbita F, Lewis S, Vouilloz JP, Ortega MA, Kade M, Abbate PE, Barneix AJ.** 2013. Effects of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm (K Gill, Ed.). *Plant Breeding* **132**, 48–52.
- Thomas H, Howarth CJ.** 2000. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* **51**, 329–337.
- Tilman D.** 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 5995–6000.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Belfort BL.** 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 20260–20264.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S.** 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**, 671–677.
- Triboi E, Martre P, Girousse C, Ravel C, Triboi-Blondel A-M.** 2006. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 108–118.
- Triboi E, Martre P, Triboi-Blondel AM.** 2003. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1731–1742.
- Triboi E, Triboi-Blondel A-M.** 2002. Productivity and grain or seed composition: a new approach to an old problem—invited paper. *European Journal of Agronomy* **16**, 163–186.
- Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**, 2290–2300.

- Tsay Y, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM.** 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705–713.
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J.** 2006. A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. *Science* **314**, 1298–1301.
- USDA.** 2015. <http://www.ers.usda.gov/>
- Van Sanford DA, MacKown CT.** 1987. Cultivar differences in nitrogen remobilization during grain fill in soft red winter wheat. *Crop science* **27**, 295–300.
- Vanoni MA, Dossena L, van den Heuvel RH, Curti B.** 2005. Structure–function studies on the complex iron–sulfur flavoprotein glutamate synthase: the key enzyme of ammonia assimilation. *Photosynthesis research* **83**, 219–238.
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD.** 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**, 307–318.
- Vogel KP, Johnson VA, Mattern PJ.** 1978. Protein and lysine contents of endosperm and bran of the parents and progenies of crosses of common wheat. *Crop Science* **18**, 751–754.
- Walch-Liu P, Forde BG.** 2008. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises l-glutamate-induced changes in root architecture. *The Plant Journal* **54**, 820–828.
- Wang R.** 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology* **136**, 2512–2522.
- Wang P, Wang Z, Cai R, Li Y, Chen X, Yin Y.** 2011. Physiological and molecular response of wheat roots to nitrate supply in seedling stage. *Agricultural Sciences in China* **10**, 695–704.
- Wieser H.** 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* **24**, 115–119.
- Yin L-P, Li P, Wen B, Taylor D, Berry JO.** 2007. Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (TaNRT2.1) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other NTR2 genes. *Plant Science* **172**, 621–631.
- Young TE, Gallie DR.** 1999. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant molecular biology* **39**, 915–926.

Chapitre 3. **Compléments d'information sur les matériels et méthodes**

Cette partie de complément informatif sur les matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail de thèse a été intégrée au manuscrit afin de décrire avec plus de précision certaines méthodologies spécifiques qui n'ont été abordées que succinctement dans les publications. Cela concerne en particulier le choix des génotypes, le système de culture « semi-hydroponique », ainsi que les travaux de recherche de séquences, d'analyse de séquences et de dessins d'amorces nécessaires aux quantifications d'expression des gènes du métabolisme azoté. Le protocole d'extraction semi-automatisé des acides nucléiques est également décrit dans cette section.

I Matériel végétal étudié

Les études visant à mettre en évidence les déterminismes d'un caractère particulier, comme ce fut le cas dans le cadre de cette thèse avec le GPD, doivent nécessairement cibler les génotypes étudiés afin de maximiser les chances de succès. En premier lieu, les génotypes sélectionnés doivent représenter un maximum de variabilité pour le caractère étudié, mais cette exigence n'est pas toujours l'unique contrainte. Les génotypes étudiés dans le cadre de cette thèse ont ainsi été sélectionnés selon plusieurs critères.

En premier lieu, le génotype « Récital » a été retenu pour des caractéristiques indépendantes de ses dispositions génétiques à absorber l'azote ou à accumuler des protéines dans le grain. En effet, le choix de Récital fut plutôt « sécuritaire », car l'équipe a historiquement acquis une très bonne connaissance de ce génotype et de son comportement dans des conditions de cultures contrôlées. Dans ce sens, Récital présente une réponse relativement constante aux conditions de chambre de culture (précocité, fertilité, maladies et verse) permettant de mettre en œuvre des expérimentations de nutrition azotée sans prendre le risque de s'exposer à des perturbations annexes liées au système de culture. Ce génotype a ainsi été retenu pour supporter la première expérimentation visant à décrire les dynamiques d'absorption d'azote post-floraison en fonction du statut azoté des plantes à floraison présentée dans le chapitre 4.

Le choix du second génotype a été conditionné par les caractéristiques de Récital. Du fait que Récital se soit avéré être un génotype à GPD négatif (GPD-) robuste dans plusieurs études multi-environnements (Oury *et al.*, 2003; Bogard *et al.*, 2010), il était nécessaire de sélectionner un génotype « complémentaire » GPD positif (GPD+). Dans les études conduites par Oury *et al.* (2003) et Bogard *et al.* (2010), le génotype « Renan » s'est avéré être un génotype à GPD+ robuste. Le couple Récital – Renan présentait également d'autres attraits ; ces génotypes ayant des précocités à floraison proches (tous deux portent l'allèle *Rht-B1b* ; Gaju *et al.*, 2011), ainsi que des niveaux de rendement comparables associés à un écart de concentration en protéines de 1,5 % (Oury *et al.*, 2003; Martre *et al.*, 2003; Le Bail *et al.*, 2005; Bogard *et al.*, 2010). Ainsi, le couple Récital – Renan est un matériel parfaitement adapté à la recherche des déterminismes du GPD. Leur précocité comparable associée au fait que leurs valeurs de GPD contrastées soient principalement déterminées par leurs teneurs en protéines sont des atouts forts, car les déterminismes du GPD se limitent dans ce cas précis aux déterminismes de la concentration en protéines des grains. Ce couple de génotypes à de ce fait été retenu pour la seconde expérimentation visant à explorer les déterminismes physiologiques et moléculaires du GPD présentée dans le chapitre 5.

II Méthodologie de culture en conditions contrôlées

Les études liées aux thématiques de nutrition sont souvent confrontées à un dilemme quant au choix de la méthode de culture. D'un côté, l'approche hydroponique permet une précision *quasi* parfaite de la disponibilité des éléments pour la plante mais est complexifiée par la nécessité d'une maîtrise rigoureuse de l'équilibre des nutriments dans la solution nutritive (notamment dans le cadre de travaux impliquant des cycles de développement longs). De l'autre côté, la culture sur substrat organique est plus souple en termes de conduite mais bien moins précise quant à la maîtrise des disponibilités élémentaires. La recherche d'une méthodologie de culture adaptée à des travaux fins de nutrition sur des stades post-floraison a conduit l'équipe à mettre au point un système de culture semi-hydroponique sur substrat neutre qui compile en grande partie les avantages des deux méthodes classiques.

Ce système repose sur un principe de micro-irrigation (ou fertirrigation) finement contrôlé à l'échelle du pot, permettant de fournir périodiquement une quantité précise de solution nutritive à chaque plante. Le substrat neutre utilisé est composé d'un mélange à parts égales de perlite et de sable disposant d'une très faible capacité de rétention des éléments. Dans ce système, les pots sont des tubes en PVC de 60 centimètres de long et de 7 centimètres de diamètre, dont le fond a été grillagé afin de retenir le substrat. Chaque tube reçoit deux plantes préalablement vernalisées dont les racines ont été lavées à l'eau. Les tubes sont positionnés dans des bacs métalliques de 0.49 m² à raison de 64 tubes par bac (Figure 3-1 p.58) afin d'obtenir une densité de plantes par mètre carré comparable à celle visée localement aux champs (260 plantes par mètre carré).



Figure 3-1 : Photographie du système de culture semi-hydroponique en fonctionnement.

Chaque tube est individuellement équipé d'un goutteur régulé par membrane (débit de deux litres par heure). Les goutteurs sont alimentés par un circuit relié à des citernes contenant les différentes solutions nutritives, et la mise en pression des circuits par des

pompes est automatisée par des minuteurs (Figure 3-2 p.59). Ce système permet de réaliser des apports finement maîtrisés de solution nutritive, et offre également l'opportunité de rapidement basculer d'une concentration de solution nutritive à une autre du fait de la faible capacité de rétention du substrat. Ce système a également permis de réaliser des apports de solutions nutritives enrichies avec l'isotope stable ^{15}N afin d'établir des mesures précises d'absorption sur vingt-quatre heures. Dans le cadre des expérimentations réalisées au cours de cette thèse, les régimes de fertirrigation pratiqués ont consisté en un apport de 66 millilitres de solution nutritive complète (adaptée de Castle and Randall, 1987) contenant 1, 4, 7 ou 10 mM de nitrates (ou encore 10 mM de nitrates enrichis en ^{15}N à un excès de 10% dans le cadre de marquages courts) toutes les trois heures.

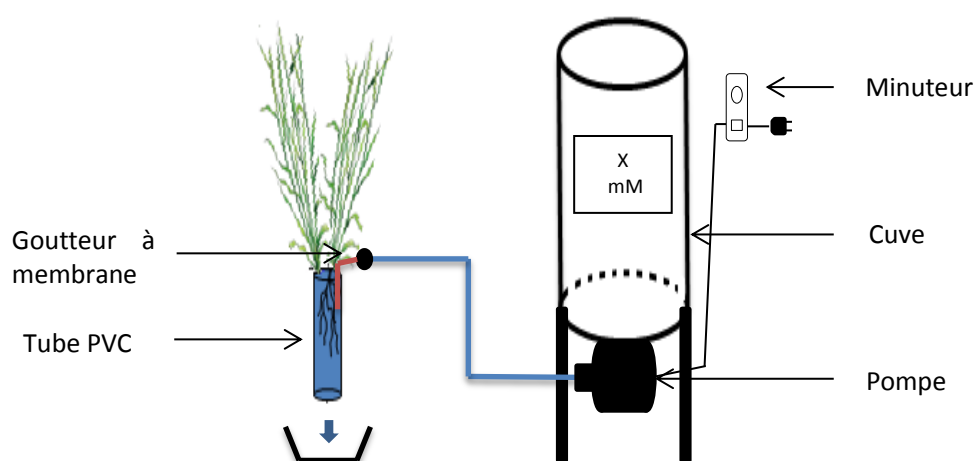


Figure 3-2 : Principe de fonctionnement du système semi-hydroponique. Chaque tube contenant deux plantes est individuellement équipé d'un goutteur dont le débit est régulé par une membrane. Ce goutteur est relié à une cuve contenant une solution nutritive déterminée. Le débit du goutteur étant connu, le volume et la fréquence des fertirrigations sont régulés par un minuteur contrôlant la pompe de mise en pression du circuit. Une pompe alimente jusqu'à 256 goutteurs en conditions expérimentales.

III Analyses de séquences des gènes du métabolisme azote

3.1. Méthodologie d'analyse des séquences

Dix-sept gènes impliqués dans le métabolisme azoté ont été travaillés dans le cadre de cette thèse, bien que tous n'aient pas été intégrés aux publications. Certaines informations relatives à leurs séquences nucléotidiques sont disponibles dans la littérature car tous ont fait l'objet d'au moins une publication. Cependant, pour certains, une seule séquence était décrite malgré la présence de trois copies homéologues du gène dans le génome du blé. Ainsi, des étapes d'identification et d'analyse de séquences ont été nécessaires pour atteindre les séquences des homéologues correspondants et pouvoir quantifier l'expression complète de ces gènes.

L'identification des séquences des gènes homéologues a été réalisée à l'aide de l'outil de recherche d'alignement local de bases (« basic local alignment search tool » ; BLAST) au sein des bases de données génomiques hébergées par les serveurs GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ainsi que par la plateforme de l'URGI (<http://wheat-urgi.versailles.inra.fr>). Le criblage des banques de données a été réalisé en utilisant la ou les séquence(s) de références comme « hameçon ». Durant cette étape, le seuil de tolérance que nous avons fixé fut de 90% d'homologie de séquences nucléotidiques. Pour la plupart des gènes, seules les trois copies homéologues présentaient ce taux d'homologie. Dans d'autres cas, plus de trois séquences très homologues étaient retenues par le criblage (*NRT2.1* par exemple).

A la suite du criblage des bases de données, les séquences présentant le taux d'homologie requis ont été comparées sur la base de leurs séquences en acides aminés. Pour les gènes dont seules trois copies avaient été retenues à l'issue de l'étape précédente, la comparaison des séquences en acides aminés a permis de valider que les gènes codaient bien pour une même protéine. Pour ceux dont plus de trois copies fortement homologues avaient été retenues, cette étape présentait l'opportunité de différencier les copies appartenant aux différents gènes. La comparaison des séquences en acides aminés a permis d'aboutir à la *quasi*-certitude de détenir les trois copies homéologues pour tous les gènes à l'exception de *NRT2.1*.

Les séquences des trois copies homéologues de chaque gène étudié ont ensuite été alignées à l'aide des logiciels SeqBuilder (DNASTAR Inc., Madison, USA) et BioEdit (www.bioedit.com/). De manière générale, SeqBuilder a été utilisé seul pour les séquences relativement simples à aligner, et les plus complexes ont été alignées manuellement avec BioEdit (notamment dans le cas de gènes présentant des délétions introniques différentes entre homéologues). Les séquences ainsi alignées étaient prêtes pour le dessin d'amorces dites « génériques », c'est-à-dire amplifiant les trois copies homéologues de chaque gène.

3.2. Cas du gène *NRT2.1*

Le cas de *NRT2.1* fut le plus complexe à résoudre, et mérite d'être détaillé bien que cela outrepassé quelque peu le cadre conventionnel de ce type de section. *NRT2.1*, fortement

impliqué dans l'absorption d'azote chez *A. thaliana*, faisait partie de nos cibles privilégiées. Cependant, une seule étude avait formellement caractérisé ce gène chez le blé (Yin *et al.*, 2007), ou plus précisément une seule des trois copies homéologues de ce gène (Accession GenBank AF332214). En plus de cette étude, une seconde publication plus récente a suivi l'expression de trois gènes de la famille des NRT2 (Accessions GenBank AF332214 ; AF288688 ; AY053452) en considérant que les deux derniers étaient *NRT2.2* et *NRT2.3* (Wang *et al.*, 2011) sans pour autant qu'ils aient préalablement été caractérisés.

Sur la base de l'unique séquence de *NRT2.1* caractérisée (AF332214), une recherche des copies homéologues correspondantes a été mise en œuvre. Le criblage de la base de données de l'URGI par BLAST a mis en évidence que cette séquence présentait un fort taux d'homologie avec 16 autres séquences, toutes positionnées sur une portion restreinte des bras courts des chromosomes du groupe six. La présence de six copies de gènes en tandem suspectés d'être des duplications de *NRT2.1* avait déjà été observée auparavant sur un BAC du génome D (de 103 Kb), sans faire l'objet de publication (Le Gouis, communication personnelle). La répartition des séquences issues du BLAST sur chaque groupe chromosomique est équilibrée : 6 séquences sur le génome D, et 5 séquences sur les génomes A et B ; suggérant qu'il s'agisse d'un groupe de gènes extrêmement homologues. Leur fort niveau d'identité rendait cependant impossible la dissociation des différents homéologues de chaque gène.

Pour contourner cet écueil, les séquences nucléotidiques de leurs promoteurs ont été comparées et ont permis de dissocier six gènes, dont quatre étaient pourvus de trois copies homéologues, et deux pour lesquels seules deux copies ont été trouvées (Figure 3-3 p.62). Cette analyse a permis de mettre en évidence que les séquences AY053452 et AF288688 (Wang *et al.*, 2011) sont deux copies homéologues d'un même gène portées par les génomes A et B et non pas deux gènes distincts. De plus, la forte homologie entre les six gènes ainsi que leur proximité physique suggèrent qu'il puisse s'agir de duplications récentes d'un même gène. L'analyse de leurs séquences en acides aminés a par ailleurs mis en évidence que chacun des six gènes disposait d'au moins une copie *à priori* fonctionnelle. La comparaison des séquences publiées de *NRT2.1* (AF332214) et du *NRT2* non caractérisé (AF288688) avec celles de gènes *NRT2* d'autres espèces (Figure 3-4 p.62) met en évidence la forte spécificité des séquences au sein de chaque espèce, bien qu'il existe une proximité plus étroite au sein des *Triticeae*. Ce constat suggère que les familles de *NRT2* puissent avoir évolué indépendamment au sein des différentes espèces observées, postérieurement aux événements de spéciation. Cela implique que la déduction des fonctions des différents *NRT2* du blé par simples comparaisons de séquences avec les *NRT2* connus d'*A. thaliana* n'est pas envisageable. Il n'est ainsi pas exclu que les gènes *NRT2* du blé puissent avoir des fonctions redondantes.

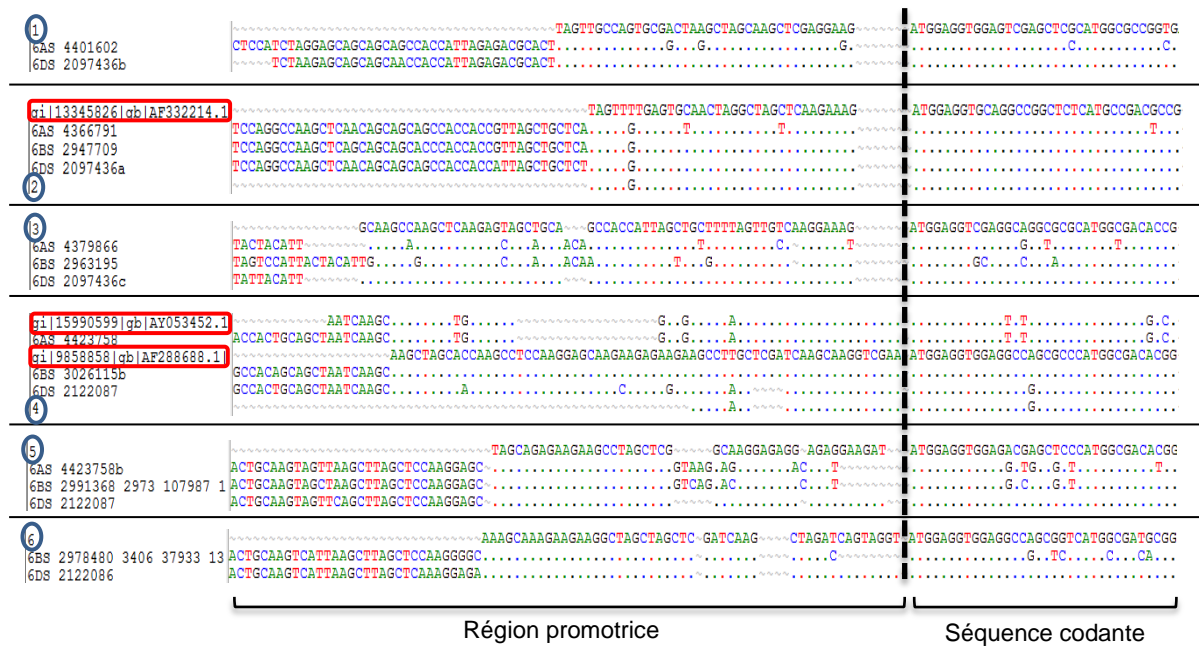


Figure 3-3 : Alignement des séquences promotrices et codantes des gènes *NRT2* putatifs du blé. Les séquences présentées sont issues de la littérature (Yin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; intitulés encadrés en rouge), d'un BAC du génome D (Le Gouis, communication personnelle ; intitulés entourés en bleu), et du BLAST de *NRT2.1* (AF332214) contre la base de données de l'URGI (intitulés non encadrés).

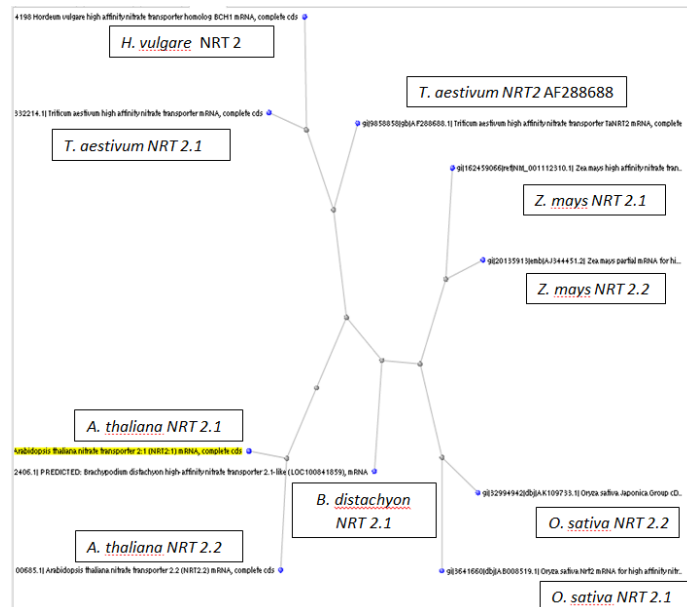


Figure 3-4 : Arbre de distances génétiques des gènes *NRT2* issus de diverses espèces.

IV Développement d'amorces génériques pour les gènes du métabolisme azoté

Des couples d'amorces génériques permettant d'amplifier les trois homéologues de chaque gène ont été dessinées à partir des alignements de séquences nucléotidiques. Les couples d'amorces mis au point répondent aux cinq critères suivants (présentés par ordre d'importance) :

- Spécificité : spécifiques aux séquences cibles.
- Généricité : Amplification des trois copies homéologues.
- Température d'hybridation de 60°C : *L'homogénéité de température d'hybridation permet de passer toutes les amorces dans des mêmes conditions PCR, et donc sur une même plaque.*
- Fragment amplifié inférieur à 500 paires de bases : *Nécessaire pour une bonne efficacité d'amplification.*
- Absence de sites de dimérisation forts : *Les dimérisations proviennent de portions de séquences complémentaires (sur l'amorce ou entre amorces) qui engendrent des liaisons réduisant l'efficacité d'amplification au cours de la réaction PCR.*

La généricité des couples d'amorces (exemple en Figure 3-5 p.63) ainsi que la taille du fragment amplifié a été validée visuellement au cours de la phase de dessin, sur la base de l'alignement des séquences homéologues. Leur spécificité a ensuite été validée par BLAST sur les bases de données disponibles (GenBank et plateforme URGI), et les paramètres de température d'hybridation (liés à la teneur en GC de la séquence) et de dimérisation ont été validés à l'aide du logiciel SeqBuilder.

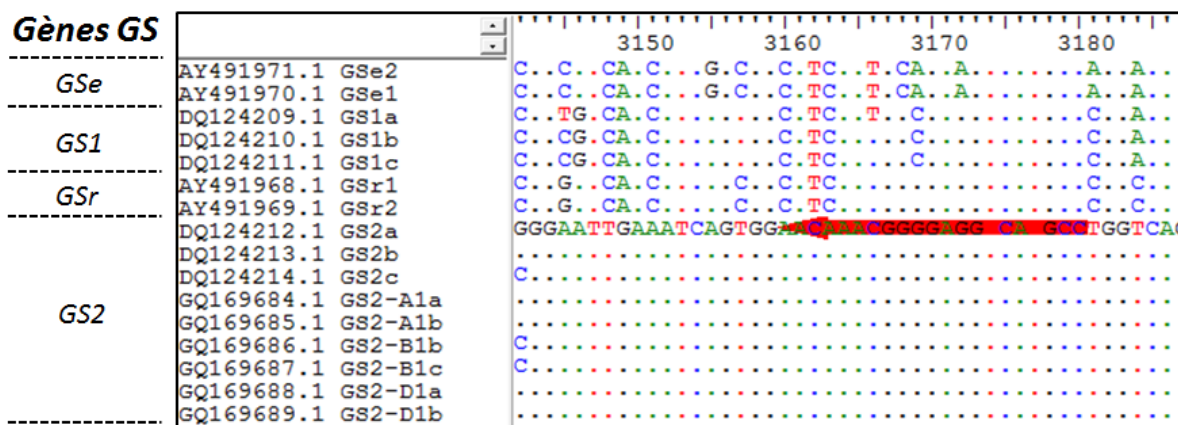


Figure 3-5: Exemple de positionnement d'une amorce « reverse » amplifiant les homéologues du gène GS2. L'alignement comporte les séquences de plusieurs allèles de GS2 disponibles dans les bases de données, mais également les gènes GS1, GSe et GSr qui présentent une homologie relativement forte avec GS2. L'intégration de ces gènes à l'alignement permet de sélectionner plus sûrement les régions spécifiques au gène cible.

Plusieurs couples d'amorces ont ainsi été dessinés pour chaque gène cible. Les couples d'amorces retenus ont ensuite été testés, afin de ne conserver qu'un couple par gène. Cette étape de tests s'est déroulée en deux phases. La première phase fut un test d'amplification par PCR classique sur des matrices ADNc issues de différents organes afin de juger grossièrement le comportement des amorces sur du matériel biologique. Un premier tri a été réalisé à la suite de cette étape, principalement sur des critères de spécificité ainsi que d'intensité d'amplification. La seconde phase de test a été réalisée en qRT-PCR (PCR quantitative en temps réel) afin de juger très précisément d'une part de la spécificité des couples d'amorces par analyse des courbes de dissociation, et d'autre part de l'efficacité d'amplification des couples qui correspond à la capacité des amorces à doubler le nombre de brins cibles à chaque cycle PCR. L'efficacité d'amplification est calculée à partir d'une gamme étalon d'ADNc, la marge de tolérance admise pour l'efficacité d'amplification (nombre de brins au cycle $n+1$ divisé par le nombre de brins au cycle n) étant comprise entre 1,9 et 2,1. Un exemple de ces étapes de validation d'amorces est présenté en Figure 3-6 p.64.

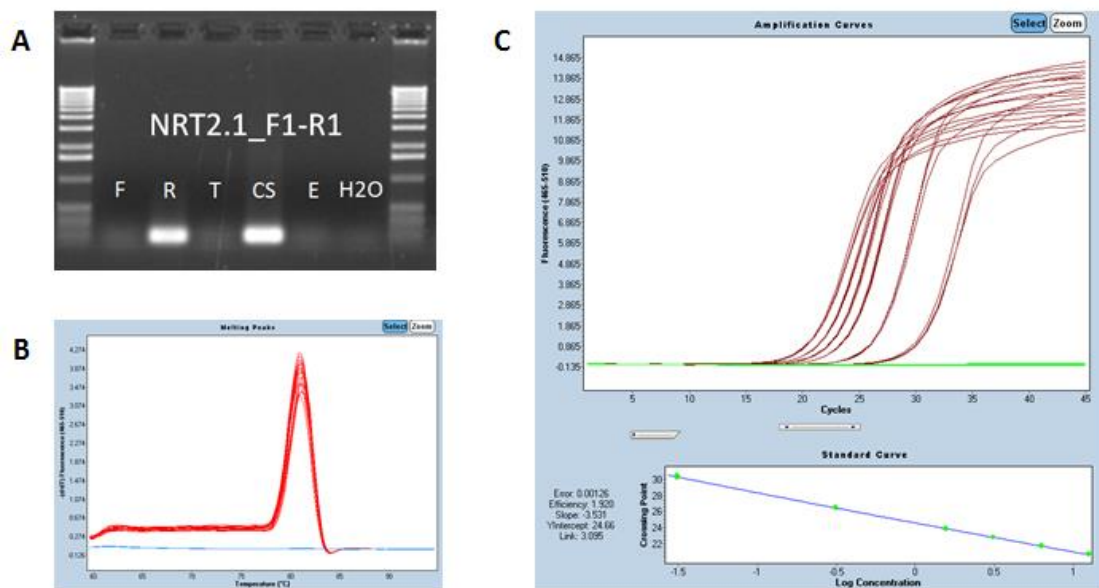


Figure 3-6 : Etapes de validation des couples d'amorces. Les couples sont testés par PCR sur des matrices d'ADNc issues de différents organes (A). Les matrices utilisées sont issues de feuilles (F), racines (R), tiges (T) et épis (E), et la PCR comprend également des témoins positif (CS) et négatifs (H2O). La spécificité des couples est ensuite validée plus formellement par l'analyse des courbes de dissociation en conditions de qRT-PCR (B). L'efficacité d'amplification des couples est enfin validée en qRT-PCR par la mesure d'efficacité d'amplification basée sur une gamme de matrices étalons d'ADNc (C).

V Choix des gènes de référence

Dans le cadre d'analyses d'expressions de gènes par une approche de qRT-PCR, les données brutes d'expression des différents échantillons doivent être normalisées par des gènes de référence (ou « gènes de ménage ») afin de s'affranchir des biais d'échantillonnage. Pour remplir cette fonction de normalisation, ces gènes de référence doivent être « ubiquitaires », c'est-à-dire qu'ils doivent présenter des profils d'expression constants dans l'espace et dans le temps. Le choix de gènes de référence adaptés aux conditions expérimentales est crucial, car la normalisation de l'ensemble des données dépend de leur stabilité. Dans le cadre d'expérimentations telles que celles réalisées au cours de cette thèse, qui impliquent une large gamme de stades de développement, plusieurs organes ainsi que différents niveaux de nutrition azotée, la sélection de gènes de référence est complexe. En effet, tous les gènes y compris les plus stables présentent de faibles variations d'expression au cours du développement, entre organes ou encore en réponse à l'environnement. Ainsi, 20 gènes de référence reconnus dans la littérature comme stables dans diverses conditions chez le blé ont été testés afin de sélectionner les plus adaptés à nos conditions expérimentales. La plupart de ces gènes de référence sont issus des travaux de Paolacci *et al.* (2009).

Le protocole de validation des gènes de référence mis en œuvre consiste à quantifier l'expression des gènes candidats issus de la littérature dans les organes étudiés à différents stades de développement post-floraison, couplés avec des conditions contrastées de nutrition azotée (Figure 3-7 p.66). Cette analyse a mis en évidence les deux candidats prometteurs *Ta54948* et *Ta54280* qui sont à la fois plus stables que le célèbre *18S* dans nos conditions expérimentales, mais également moins fortement exprimés, ce qui leur confère une plus grande précision de normalisation. Un gène de ménage est considéré comme très stable lorsque ses niveaux d'expression présentent des variations inférieures à 1 Cp entre les échantillons extrêmes, correspondant à facteur 2 du nombre de transcrits. Dans notre cas, du fait de la large gamme de variation spatio-temporelle et environnementale, nous avons été contraints d'abaisser ces exigences à 1,5 Cp. Les gènes *Ta54948* et *Ta54280* codent respectivement pour une protéine RAB GTPase appartenant à la sous-famille RAB7 (impliquée dans le trafic membranaire) et pour une protéine facteur d'initiation de traduction de la famille SUL-1 (Paolacci *et al.*, 2009). Une fois les gènes de référence *Ta54948* et *Ta54280* sélectionnés, leurs efficacités d'amplification ont été validées selon la méthode décrite précédemment.

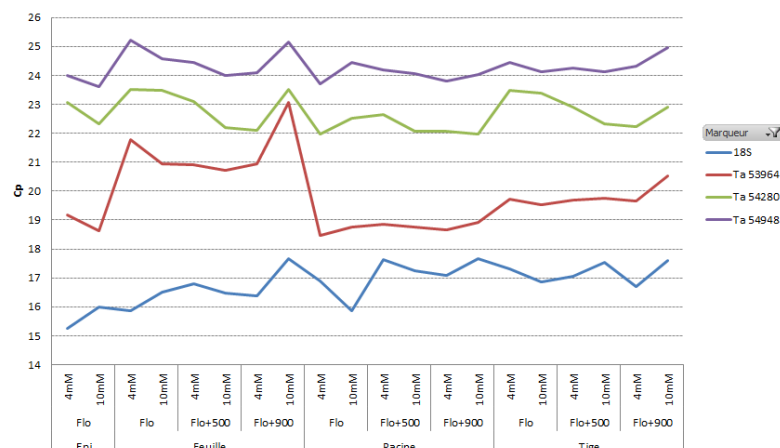


Figure 3-7 : Exemples de profils d'expression de quatre gènes de ménage testés. Les expressions de ces gènes ont été observées dans des épis, feuilles, racines et tiges aux stades floraison (Flo), Flo+500 degrés-jours, et Flo+900 degrés-jours en conditions de 4 ou 10 mM d'azote dans la solution nutritive. Le gène *18S* a été utilisé comme base de comparaison car il a très largement été référencé dans la littérature. Les gènes *Ta54948* et *Ta54280* présentent des niveaux d'expression relativement stables dans le temps et l'espace, ainsi qu'en réponse à la disponibilité de l'azote. A l'inverse, le gène *Ta53964* n'a pas été retenu du fait de son inconstance d'expression dans nos conditions.

VI Extraction des acides nucléiques

6.1. Le choix d'une méthode semi-automatisée

L'extraction et la purification des ARN est une étape cruciale dans les études s'intéressant aux expressions de gènes. La qualité des ARN (autrement dit leur niveau d'intégrité), ainsi que leur pureté (signifiant l'absence d'ADN génomique résiduel) sont deux conditions *sine qua non* à la réalisation d'une quantification de transcrits exempte de biais. Ces deux conditions sont cependant parfois complexes à remplir car les procédés d'extraction et de purification sont relativement délicats. Les ARN sont sensibles à la température et ont tendance à se dégrader très rapidement au moindre faux pas. En plus des aspects purement qualitatifs, les étapes d'extraction des ARN sont trop souvent des opérations lourdes à réaliser ; certains protocoles s'étalent sur plusieurs jours. Néanmoins, il est généralement complexe de concilier rapidité d'exécution et qualité. L'objectif prioritaire étant sans conteste la qualité des ARN, les séries d'extraction de nombreux échantillons représentant une forte charge de travail. Un protocole semi-automatisé d'extraction d'ARN avait depuis quelque temps été développé pour les tissus végétaux par des sociétés privées, mais n'était pas utilisable en l'état pour les tissus de blé. Ce protocole permet d'extraire les ARN en plaques de 96 puits en utilisant le robot Biosprint (Qiagen, Venio, Pays-Bas) (Figure 3-8 p.67). Afin d'adapter la méthode au blé, ce protocole a été conjointement modifié par l'équipe ABC, la société Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) et la plateforme de séquençage et de génotypage à haut débit *Gentyane* de l'INRA de Clermont-Ferrand (<http://gentyane.clermont.inra.fr>). Les modifications apportées reposent sur l'ajustement des volumes de tampons utilisés lors de l'extraction, ainsi que sur la durée des différentes étapes du processus d'extraction. Avec cette méthode, les ARN de 96 échantillons sont extraits en moins de deux heures. Ce protocole est fonctionnel pour des échantillons de feuilles, de tiges et de racines mais ne convient pas à l'extraction des acides nucléiques issus des grains du fait de la présence d'amidon qui rend le lysat trop visqueux.

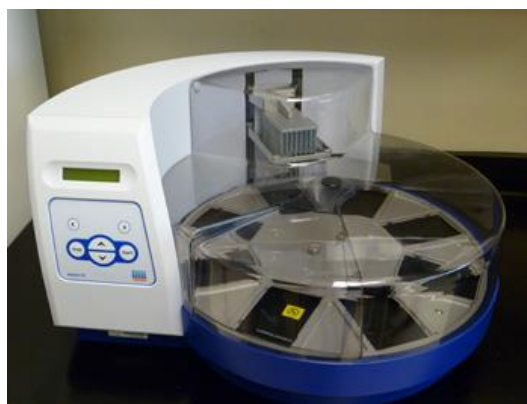


Figure 3-8 : Robot Quiagen Biosprint (Qiagen, Venio, Pays-Bas).

6.2. Protocole d'extraction des ARN

Les extractions d'ARN ont été réalisées sur 100 mg de broyat à l'aide du kit Nucléomag 96 RNA (Macherey-Nagel). Le principe d'extraction repose sur l'adsorption des acides nucléiques par des billes paramagnétiques sous des conditions particulières de salinité et de concentration en alcools des tampons. Cette technologie permet à la fois l'extraction des acides nucléiques du lysat cellulaire, mais également leur convoi dans une solution contenant une enzyme DNase (qui fragmente l'ADN génomique), puis dans des tampons de lavage successifs (permettant d'éliminer les résidus de sels et d'éthanol issus des tampons d'extraction), et enfin dans une solution d'élution (Figure 3-9 p.68).

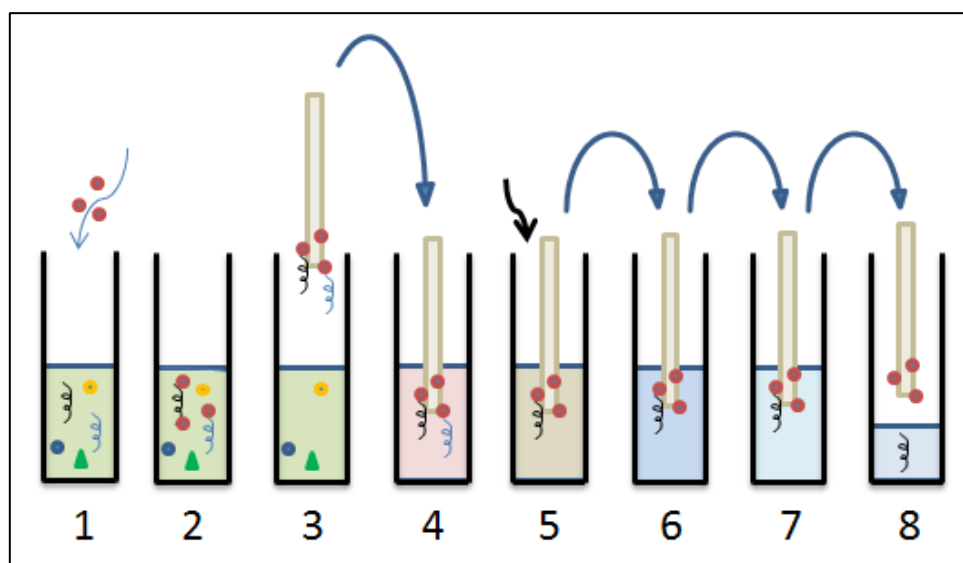


Figure 3-9 : Principe d'extraction d'ARN à l'aide de billes paramagnétiques. Des billes magnétiques et du tampon MR2 sont ajoutés au lysat (1). Les billes adsorbent les acides nucléiques (2). Une tête aimantée vient « pêcher » les billes ainsi que les acides nucléiques adsorbés (3). La tête aimantée plonge les billes et les acides nucléiques dans une solution de DNase qui désagrége l'ADN génomique(4). Après une incubation dans la solution de DNase, du tampon MR2 est ajouté afin de stopper la digestion enzymatique (5). Les billes chargées d'ARN sont ensuite successivement convoyées dans des tampons de lavage (MR3 et MR4 ; 6 et 7). Les ARN purifiés sont enfin élués dans un tampon d'élution MR5 (8).

L'étape de lyse cellulaire est réalisée dans des tubes eppendorf de 2 ml, par des ajouts de 7,8 µl de TCEP et de 500 µl de tampon MR1 par échantillon. La lyse dure 30 minutes à température ambiante. A la suite de cette étape, les échantillons sont centrifugés 20 minutes (6000 g ; 20°C) afin de faire culotter les débris cellulaires. Les surnageants sont prélevés puis placés dans une plaque de 96 puits. Avant de lancer le cycle du robot, 31,25 µl de « B-Beads » (billes magnétiques en suspension) et 401 µl de MR2 sont ajoutés à chaque

échantillon. L'utilisation du robot nécessite la préparation préalable de cinq plaques supplémentaires :

- Une plaque « DNase » contenant 276 µl de Tampon de réaction DNase et 24 µl d'enzyme DNase en solution dans chaque puits.
- Une plaque de lavage N°1 contenant 600 µl de tampon MR3 par puits.
- Une plaque de lavage N°2 contenant 900 µl de tampon MR4 par puits.
- Une plaque de lavage N°3 contenant 900 µl de tampon MR4 par puits.
- Une plaque d'élution contenant 60 µl de tampon MR5.

L'ensemble des plaques sont placées dans le robot dès le départ du programme. Le premier cycle du robot consiste en une agitation des billes suspendues dans le surnageant pendant 10 minutes. Ensuite, les têtes magnétiques du robot s'activent et pêchent les acides nucléiques (ADN et ARN) adsorbés sur les billes. Les acides nucléiques sont ensuite mis automatiquement à incuber pendant 30 minutes dans la plaque contenant la solution de DNase. Après la phase d'incubation, le robot se met en pause. Il faut alors manuellement stopper la réaction de digestion enzymatique en ajoutant 400 µl de tampon MR2 dans chaque puits. L'ADN génomique ayant en grande partie été dégradé, les acides nucléiques restants sont en majorité des ARN. Une fois la plaque remis à sa position dans le robot, le cycle est relancé. Les ARN vont alors subir des lavages successifs : le premier dans du tampon MR3, et les deuxième et troisième dans du tampon MR4 afin d'éliminer les sels et les éventuels contaminants. Chaque étape de lavage dure 5 minutes. Les billes chargées d'ARN sont ensuite séchées brièvement à l'air pour éliminer les traces d'éthanol, avant d'être transférées dans la solution de tampon d'élution MR5 qui inhibe la capacité des billes à retenir les acides nucléiques. Les ARN ainsi libérés dans le tampon d'élution sont directement placés sur glace en attendant leur dosage.

L'utilisation du procédé d'extraction robotisé présente cependant l'inconvénient de nécessiter une étape supplémentaire de purification des ARN. En effet, pour des quantifications relativement fines de type qRT-PCR, la présence, même très faible, d'ADN génomique résiduel perturbe la mesure d'expression. Les résidus d'ADN génomiques sont éliminés par d'une étape de purification des ARN réalisée avec le kit Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel), qui comprend notamment une étape de DNase supplémentaire. Le protocole de purification ne nécessite pas d'être détaillé car il n'a pas fait l'objet de modifications.

L'utilisation du protocole d'extraction adapté aux tissus de blé couplé à la purification des échantillons permet d'obtenir des ARN de très bonne qualité (Figure 3-10 p.70).

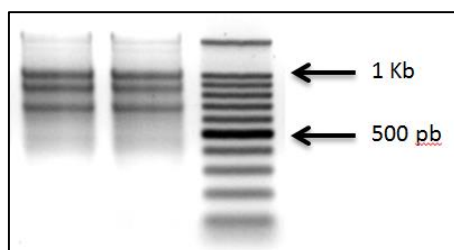


Figure 3-10 : Photographie d'ARN de bonne qualité. La netteté des trois bandes caractéristiques des ARN ribosomiques met en évidence l'intégrité des ARN déposés dans le puits de gauche et le puits central. Le puits de droite représente l'échelle de migration dont la bande la plus intense est un fragment de 500 paires de bases. La photographie a été réalisée sous lumière ultra-violette après un bain de BET de 10 minutes. La migration de 0,5 μ g d'ARN additionné de 8 μ l de tampon de charge a duré 30 minutes sur un gel d'agarose 1%.

Références

- Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J-M, Jeuffroy M-H, Gate P, Martre P, Le Gouis J.** 2010. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4303–4312.
- Castle SL, Randall PJ.** 1987. Effects of sulfur deficiency on the synthesis and accumulation of proteins in the developing wheat seed. *Functional Plant Biology* **14**, 503–516.
- Gaju O, Allard V, Martre P, et al.** 2011. Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Research* **123**, 139–152.
- Le Bail M, Jeuffroy M-H, Bouchard C, Barbottin A.** 2005. Is it possible to forecast the grain quality and yield of different varieties of winter wheat from Minolta SPAD meter measurements? *European Journal of Agronomy* **23**, 379–391.
- Martre P, Porter JR, Jamieson PD, Triboui E.** 2003. Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology* **133**, 1959–1967.
- Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Pluchard P, Rousset M, Galic N.** 2003. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program [*Triticum aestivum* L.]. *Journal of Genetics and Breeding* **57**.
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M.** 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology* **10**, 11.
- Wang P, Wang Z, Cai R, Li Y, Chen X, Yin Y.** 2011. Physiological and molecular response of wheat roots to nitrate supply in seedling stage. *Agricultural Sciences in China* **10**, 695–704.
- Yin L-P, Li P, Wen B, Taylor D, Berry JO.** 2007. Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (TaNRT2.1) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other NTR2 genes. *Plant Science* **172**, 621–631.

Chapitre 4. **Post-flowering nitrate uptake in wheat is controlled by N status at flowering, with a putative major role of root nitrate transporter NRT2.1.**

François Taulemesse^{1,2,3}, Jacques Le Gouis^{1,2}, David Gouache³, Yves Gibon⁴, Vincent Allard^{1,2*}

¹ INRA, UMR 1095 Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, Clermont-Ferrand, France

² Université Blaise Pascal, UMR 1095 Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, Aubière, France

³ Arvalis-Institut du Végétal, Service Biotechnologies, Boigneville, France

⁴ INRA, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Ornon, France

* Corresponding author:

E-mail : vincent.allard@clermont.inra.fr

I Abstract

In bread wheat (*Triticum aestivum* L.), the simultaneous improvement of both yield and grain protein is difficult because of the strong negative relationship between these two traits. However, some genotypes deviate positively from this relationship and this has been linked to their ability to take up nitrogen (N) during the post-flowering period, regardless of their N status at flowering. The physiological and genetic determinants of post-flowering N uptake relating to N satiety are poorly understood. This study uses semi-hydroponic culture of cv. Récital under controlled conditions to explore these controls. The first objective was to record the effects of contrasting N status at flowering on post-flowering nitrate (NO₃⁻) uptake under non-limiting NO₃⁻ conditions, while following the expression of key genes involved in NO₃⁻ uptake and assimilation. We found that post-flowering NO₃⁻ uptake was strongly influenced by plant N status at flowering during the first 300–400 degree-days after flowering, overlapping with a probable regulation of nitrate uptake exerted by N demand for growth. The uptake of NO₃⁻ correlated well with the expression of the gene *TaNRT2.1*, coding for a root NO₃⁻ transporter, which seems to play a major role in post-flowering NO₃⁻ uptake. These results provide a useful knowledge base for future investigation of genetic variability in post-flowering N uptake and may lead to concomitant gains in both grain yield and grain protein in wheat.

II Introduction

Although grain yield (GY) remains the main breeding priority for wheat breeders, grain protein concentration (GPC) is another important priority, as GPC is a key element of wheat end-use value [1,2] and thus determines both the price paid to the farmer per tonne and also the opportunity for achieving export quality. However, the strongly negative relationship between GY and GPC [3,4] complicates the simultaneous improvement in these two traits, as increases in GY are generally detrimental to GPC. A classic agronomic strategy for obtaining high GY with adequate GPC in high-input agriculture is based on growing genotypes having strong yield potential, coupled with fertilisation practices that favour high GPC. In particular, delaying the last nitrogen (N) fertiliser application at heading, allows the low GPC, potentially associated with high GY, to be increased to an acceptable level. However, this approach is increasingly being questioned in a world where there is increasing pressure to reduce N inputs, both because of its rising cost and also because of a rising awareness of the environmental damage resulting from excessive N use in agriculture [5].

Monaghan *et al.* [6] proposed an alternative strategy for improving GPC without decreasing GY, thus breaking the negative GY-GPC relationship. This strategy originates from the observation that some genotypes exhibit robust deviations (whether positive or negative) from the regression of GPC on GY. This deviation, grain protein deviation (GPD), has a strong genetic basis [4,7] and has interesting potential as a breeding criterion. Based on this proposition, some studies have focused on identifying the physiological basis of genetic variability in GPD. In particular, Bogard *et al.* [8] showed that GPD was highly correlated with post-flowering N uptake regardless of plant N status at flowering. This led to the hypothesis that GPD could be conditioned by a putative genetic variability in the control of N satiety, that would allow some varieties to absorb more N after flowering. Testing of such a hypothesis demands a better understanding of post-flowering N uptake in wheat and its regulation by plant N status.

Grain N originates from two distinct sources: remobilisation from vegetative organs of N assimilated pre-flowering, and post-flowering uptake of N from the soil. The relative contributions to grain N of these two sources are negatively correlated [6,8,9], and are strongly dependent on environmental factors [10]. Typically, for wheat under field conditions, post-flowering N uptake contributes between 5 and 40% to total grain N [8,11–13]. The fraction depends also on growing context and, to a lesser extent, on genotype. A number of experiments have been carried out on wheat and barley under controlled conditions to study N uptake, including during the post-flowering period. These offer interesting understandings, such as of effects of N availability on the dynamics of biomass accumulation and N concentration [14], of N uptake dynamics under N-limiting conditions [15], of root N uptake capacity during the post-flowering period [16], and of the fate of the N taken up post-flowering [17]. Nevertheless, little is known of the kinetics of post-flowering N uptake, or of the associated control mechanisms. New information is needed at both the whole plant scale and at the molecular scale. In the latter case, the conservation of the metabolic pathways

associated with both N uptake and N assimilation in higher plants, offers useful tools for studying post-flowering N uptake at the molecular scale.

Several recent reviews provide an extensive view of known mechanisms of N uptake and assimilation [18–21]. Uptake of N appears to be regulated mainly by plant demand [22,23]. However, a major area of continuing discussion among authors centres on the nature of the signal for N satiety. This has been proposed to be: (a) NO_3^- [24–26] or (b) circulating amino-acids such as glutamine [27,28]. The principal forms in which N is taken up from the soil by plants are as nitrate (NO_3^-) and as ammonium (NH_4^+), with NO_3^- being preferred under aerobic conditions [29]. In higher plants, NO_3^- uptake involves two distinct systems classified according to their affinities for NO_3^- . The low-affinity transport system (LATS) is predominant when N concentrations ($[\text{N}]$) in the medium are high, with a K_m constant in the mM range. The high-affinity transport system (HATS) operates under low $[\text{N}]$ conditions, with a K_m in the μM range [19].

LATS is coded by the NRT1 gene family which has 53 known members in *Arabidopsis thaliana* while HATS is coded by the NRT2 gene family which has seven members in *A. thaliana*. Among the LATS family, *AtNRT1.1* (*CHL1*) is the most studied, and both it and *AtNRT1.2* are expressed in the root epidermis and participate in NO_3^- uptake [30]. Meanwhile, *AtNRT1.1* is a dual-affinity transporter being both constitutive and inducible, and it is involved in NO_3^- uptake under both high- and low- NO_3^- concentrations [31]. Moreover, it has recently been shown that *AtNRT1.1* can transport both NO_3^- and/or auxin depending on the external concentrations of NO_3^- [32]. In rice, *Oryza sativa*, *OsNRT1* is the homolog of *AtNRT1.1* and has been cloned and characterised as a low-affinity NO_3^- transporter which is expressed constitutively in the root epidermis [33]. Based on sequence homology approaches, a number of other putative NRT1 family members (homologous to the *A. thaliana* NRT1 family) have been found in a range of species including: *Cucumis sativus*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor* and *Brachypodium distachyon* [34,35]. Although homologues of most members of the *A. thaliana* NRT1 gene family probably exist in wheat, to our knowledge, only one has been studied [36].

The two main genes expressed in *A. thaliana* roots coding for HATS are *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2*. Of these, *AtNRT2.1*, in interaction with an *AtNAR2* protein [37] accounts for about 75% of the high-affinity NO_3^- uptake [38]. These genes are induced by low NO_3^- concentration ($[\text{NO}_3^-]$) and repressed by high $[\text{NO}_3^-]$ and so belong to the group of inducible HATS. The HATS NO_3^- uptake system is also implicated in plant responses to N starvation. Expression of *AtNRT2.1* increases rapidly when NO_3^- is supplied to N-starved plants but later decreases if the provision of NO_3^- is maintained [39]. Putative homologues of the main HATS coding genes in maize are *ZmNRT2.1* and *ZmNRT2.2*. These were detected by the sequence homology approach [34] and were later studied under hydroponic conditions where they seem to play a key role in N uptake even at $[\text{NO}_3^-]$ higher than 1 mM [40]. The orthologue of *AtNRT2.1* in wheat is *TaNRT2.1*, and this has been characterised and its expression profiles suggest that it too belongs to the inducible HATS [41]. To our knowledge, *TaNRT2.1* is the only member of the NRT2 gene family currently characterized in wheat.

Following its uptake, NO_3^- is reduced to nitrite (NO_2^-) by nitrate reductase (NR) and the NO_2^- is subsequently reduced to ammonium by nitrite reductase (NiR) [42]. A loop between glutamine synthetase 2 (GS2) and the two forms of glutamine 2-oxoglutarate amino transferase (GOGAT), NADH-GOGAT and Fd-GOGAT, finally integrate the N into amino acids [43]. Genes involved in N reduction and assimilation have been investigated in wheat [44–46].

The objective of our study was to provide a clearer view of post-flowering NO_3^- uptake dynamics in wheat in relation to the N status at flowering. To study the uptake of NO_3^- in detail, a semi-hydroponic approach under controlled conditions was established because of its susceptibility to environmental factors. Wheat plants (cv. Récital) were grown under four pre-flowering conditions with contrasting levels of $[\text{NO}_3^-]$. At flowering, all conditions were altered to be NO_3^- non-limiting, allowing plants to fully exploit their NO_3^- uptake potentials. The use of ^{15}N pulse labelling allowed detailed recording of the dynamics of post-flowering NO_3^- uptake and relative quantification of the expression of the main genes involved in both NO_3^- uptake and assimilation and enabled links to be observed between gene expression and NO_3^- uptake.

III Materials and methods

3.1. Plant material

Selected wheat grains (55 to 60 mg) of cv. Récital were sown in germination trays filled with compost and placed in a heated greenhouse at 20°C for 14 days. After emergence, plants were vernalised for six weeks in a plant growth chamber (6°C, 8 h photoperiod, light intensity 350 $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$). After vernalisation, the roots were washed free of compost and plants were transplanted into PVC tubes (7 cm diam, 60 cm high) filled with a perlite:sand mixture (1:1, v:v) for semi-hydroponic culture. The lower end of each tube was closed with a perforated cap to contain the substrate while allowing excess nutrient solution to drain. Two plants were transplanted into each tube and tubes were placed vertically in eight containers (64 tubes per container, container area 0.49 m²). The resulting planting density (260 plants m⁻²) is comparable to that in the field under local agronomic practices.

Containers were placed in a growth chamber under a long-day photoperiod (16 h light at 20°C, 8 h dark at 18°C). Light intensity was 650 $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Air temperature, humidity and light intensity at canopy level were recorded every 15 min using a CR1000 datalogger (Campbell Scientific, Logan, Utah, USA). Each tube was fitted with an automated micro-irrigation system, receiving one of four different nutrient solutions containing 1, 4, 7 or 10 mM NO₃⁻ (the four nutrient treatments are referred to as N1, N4, N7 or N10, respectively). The nutrient solution compositions were adapted from Castle and Randall [47] (S1 Table, Annex 1). Two of the eight containers were irrigated with each of the nutrient solutions, with each tube receiving 66 ml of nutrient solution every three hours.

The flowering date (Zadok's GS65) of each main stem was recorded. From flowering to maturity, all containers were irrigated with 66 ml every three hours of the same nutrient solution containing 10 mM of NO₃⁻. Before each sampling, a subset of plants from each treatment (8 tubes per NO₃⁻ pre-flowering condition) were submitted to 24 h of pulse labelling with ¹⁵N by watering with 66 ml every three hours of a 10 mM NO₃⁻ nutrient solution enriched in ¹⁵N by 10%.

3.2. Sampling protocol

Eight sampling dates were chosen during the post-flowering period. The first destructive sampling took place one day after flowering (GS65) and the remainder at approximately GS65+ 125, 250, 400, 500, 600, 800 and 1200 degree-days (DD) base 0°C. Each sampling was made at the same time of day (1-2 h after the start of the light period). On each sampling date, 16 tubes (32 plants) from each of the four NO₃⁻ treatments were collected. Of these, four were used for physiological measurements and analysis of total nitrogen, four for gene expression and NO₃⁻ analysis and the remaining eight for ¹⁵N analysis. Each tube (two plants) was considered a biological replicate.

3.3. Physiological measurements and total nitrogen sample analysis

Physiological analyses were performed on four biological replicates. The processing of the two plants from each tube consisted first of counting the number of tillers and spikes per tube. The plants were then separated into six fractions; grains, chaff, stems (including leaf sheaths), green laminae, dry laminae, and roots. At stage GS65, in the absence of developed grains, ears were not separated into grain and chaff. All samples were oven dried to constant weight for 48 h at 80°C before dry weight (DW) measurement. Dry samples were ground to a fine powder using a ball mill and total nitrogen concentration was measured with the Dumas combustion method using a Flash EA 1112 Series CNS analyser (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).

3.4. Analysis of ^{15}N

Plants exposed to ^{15}N pulse labelling were oven dried for 48 h at 80°C before DW measurement and ground before shipping to the UC Davis Stable Isotope Facility (Davis, CA, USA) for ^{15}N abundance determination where samples were analysed using a PDZ Europa ANCA-GSL elemental analyser interfaced to a PDZ Europa 20-20 isotope ratio mass spectrometer (IRMS) (Sercon Ltd., Cheshire, UK). The ^{15}N analyses were performed on eight biological replicates.

3.5. Gene expression and NO_3^- concentration assay sample preparation

The same samples were used to assay gene expression and NO_3^- concentrations. Roots, stems and flag leaves of the two plants from each tube were pooled to form one biological replicate per organ, ground in liquid nitrogen, and stored at -80°C pending analysis.

3.6. NO_3^- concentration assays

Root, stem and flag leaf sub-samples (10 mg) were shipped to the Bordeaux INRA Metabolome Platform (https://www.bordeaux.inra.fr/umr619/RMN_index.htm; Bordeaux, France) for determination of NO_3^- concentrations using a spectrophotometry method as described in Cross *et al.* [48]. The NO_3^- assays were performed on four biological replicates.

3.7. qRT-PCR experiments

Total RNA was extracted from three biological replicates of root, stem and flag leaf samples from treatments N4 and N10 for the first seven sampling dates. Samples from the final sampling date were not extracted because of their advanced state of senescence. About 100 mg of frozen powder were used for each RNA extraction which was carried out using the Nucleomag 96 RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) on the Biosprint 96 (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA samples were then purified with the NucleoSpin 96 RNA kit (Macherey-Nagel). The RNA quality was observed by migration in agarose gel. Reverse

transcription of 1 µg of RNA was carried out with the iScript Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Richmond, California). The three steps - extraction, purification and reverse transcription - were carried out according to the manufacturer's instructions.

Primer pairs were developed to quantify expression levels of *TaNRT1* (GenBank AY587264), *TaNRT2.1* (GenBank AF332214.1), *TaGS2* (GenBank DQ124212.1), *TaNiR*, *TaFd-GOGAT* and *TaNADH-GOGAT* (whose partial sequence coming from Boisson *et al.* [44]) (S2 Table, Anexe 1). All couples developed were generic and, thus, amplified three homeologous copies. The specificity of the primer pairs and their efficiency were validated between 85 and 100%.

The quantitative real-time PCR experiment (qPCR) was carried out on a LightCycler 480 system (Roche, Indianapolis, Indiana) with the LightCycler 480 SYBR Green 1 Master Kit. The qPCR program involved pre-incubation for 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of amplification, each consisting of denaturation for 10 s at 95°C, followed by annealing for 15 s at 60°C and finishing with elongation at 72°C for 15 s. To ensure that single products were amplified, a melting curve was analysed at the end of each assay. Because of relatively low expression levels, the two NO₃⁻ transporter genes were analysed with the cDNA template diluted to 1/8, while for all other genes the cDNA template was diluted to 1/20. qPCR was carried out using a 15 µl reaction volume containing 5 µl diluted cDNA, 7.5 µl SYBR green mix, 0.75 µl each of 10 µM forward and reverse primers and 1 µl of water. Relative expression was determined using the Δ CT method corrected for primer efficiency [49]. Results were normalised to the expression of two housekeeping genes, Ta54280 and Ta54948, selected from Paolacci *et al.* [50] (S2 Table, Annex 1) whose expression stability had already been validated under our experimental conditions.

3.8. Data availability

Raw data from physiological measurements, NO₃⁻ uptake measurements, metabolites concentration assays and gene expression quantifications used in the study are available as supplementary data (S3 Dataset, Annex1).

3.9. Statistical analyses

Results were analysed after conversion to a per-square-meter basis, using tube surface area. All statistical analyses were carried out using R v2.15.1 [51], and graphics were drawn using SigmaPlot v8.0.

3.10. Nitrogen nutrition index

The N nutrition index (NNI) was calculated at flowering as the above-ground N concentration divided by the critical plant N concentration. The critical plant N concentration is defined as the minimum N concentration needed for maximum growth rate [52]. The

critical N concentration was calculated using the equation of the critical N concentration curve for cereals proposed by Justes *et al.* [53].

IV Results

4.1. Effects of pre-flowering NO_3^- treatments on plant morphology, biomass and N concentration

Four levels of NO_3^- in the nutrient solutions were used until flowering (1, 4, 7 and 10 mM, respectively referred to as N1, N4, N7 and N10). These led to highly contrasting tiller numbers, biomasses and N concentrations at flowering (Table 4-1 p.80). Tiller number increased significantly with rising $[\text{NO}_3^-]$. Values lay between 522 tillers m^{-2} for N1, and 1371 tillers m^{-2} for N10, indicating a strong morphological response to rising N. Tiller number increased linearly with $[\text{NO}_3^-]$ ($r^2=0.99$, $p=0.005$; data not shown), with an average slope of 92.5 tillers m^{-2} per mM of $[\text{NO}_3^-]$. Plant biomass ranged from 393 gDW m^{-2} for N1 to 1702 gDW m^{-2} for N10. Even though the biomass difference between plants at flowering from N4 to N7 was not significantly different ($p=0.168$), a linear regression across the four $[\text{NO}_3^-]$ treatments vs plant biomass did reveal a significant relationship ($r^2=0.95$, $p=0.026$; data not shown). This trend shows that all treatments lay within a range where $[\text{NO}_3^-]$ was limiting for plant growth. Plant N concentration (plant [N]) at flowering increased strongly and linearly with nutrient $[\text{NO}_3^-]$ ($r^2=0.99$, $p=0.003$; data not shown). The average slope was 0.183 percentage points of plant [N] per mM of NO_3^- .

Table 4-1 : Tiller number, plant dry weight, plant N concentration, total plant N and NNI at flowering for the four NO_3^- treatments. Values are the means of four biological repetitions ± 1 standard error (SE). Statistically non-significantly different groups (Tukey multiple comparisons, $p < 0.05$) are labeled with the same lowercase letter. NNI = Nitrogen Nutrition Index.

NO_3^- treatment	Tiller number (m^{-2}) \pm SE	Plant dry weight (g m^{-2}) \pm SE	Plant N concentration (%DW) \pm SE	Total plant N (g m^{-2}) \pm SE	NNI \pm SE
N1	522 \pm 53 <i>d</i>	393 \pm 33 <i>c</i>	1.512 \pm 0.078 <i>c</i>	5.88 \pm 0.30 <i>d</i>	0.50 \pm 0.01 <i>d</i>
N4	784 \pm 53 <i>c</i>	1100 \pm 17 <i>b</i>	2.133 \pm 0.062 <i>bc</i>	23.47 \pm 0.83 <i>c</i>	1.12 \pm 0.02 <i>c</i>
N7	1012 \pm 63 <i>b</i>	1335 \pm 149 <i>b</i>	2.710 \pm 0.264 <i>ab</i>	35.08 \pm 1.24 <i>b</i>	1.53 \pm 0.07 <i>b</i>
N10	1371 \pm 38 <i>a</i>	1702 \pm 83 <i>a</i>	3.145 \pm 0.161 <i>a</i>	53.15 \pm 0.81 <i>a</i>	1.95 \pm 0.09 <i>a</i>

All the above trends are supported by a calculation of NNI at flowering (Table 4-1 p.80), which shows a significant linear response to NO_3^- ($r^2=0.99$, $p=0.005$; data not shown). The average increase was 0.22 points per mM of $[\text{NO}_3^-]$. With regard to the critical nitrogen dilution curve developed for wheat [53], only N1 appeared to be limited by N status with NNI less than 1. This index was developed for field crops, so it should be used carefully under our conditions, nevertheless it clearly indicates a differential effect for the four $[\text{NO}_3^-]$ treatments used in our study.

After flowering, all plants were exposed to the same, non-limiting 10 mM NO₃⁻ nutrient solution. At maturity, the DW hierarchy between treatments was conserved (Table 4-2 p.81) although there was no significant difference between N7 and N10. The range of DW was fairly consistent with values of 1701, 2966, 4637 and 4822 gDW m⁻² for N1, N4, N7 and N10, respectively. For plant [N] at maturity, despite no significant differences between N1, N4 and N10, there did seem to be a trend for plants having been exposed to high pre-flowering N, to have less plant [N] at maturity. Plant [N] at maturity was 2.1 and 2.2%DW for the high-NO₃⁻ treatments (N7 and N10, respectively) and 2.4 and 2.5% DW for the low-NO₃⁻ treatments (N1 and N4, respectively).

Table 4-2 : Plant dry weight, plant N concentration, grain yield, grain N concentration and harvest index at maturity for the four NO₃⁻ treatments. Values are the means of four biological repetitions ± 1 standard error (SE). Statistically non-significantly different groups (Tukey multiple comparisons, *p* < 0.05) are labeled with the same lowercase letter.

NO ₃ ⁻ treatment	Plant dry weight (g m ⁻²) ±SE	Plant N concentration (%DW) ±SE	Total plant N (g m ⁻²) ±SE	Grain yield (g m ⁻²) ±SE	Grain N concentration (%DW) ±SE	Total grain N (g m ⁻²) ±SE	Harvest index ±SE
N1	1701± 187 <i>c</i>	2.438± 0.061 <i>a</i>	41.40± 4.43 <i>c</i>	690± 103 <i>b</i>	3.050± 0.107 <i>a</i>	20.79± 2.45 <i>b</i>	0.44± 0.02 <i>a</i>
N4	2966± 251 <i>b</i>	2.452± 0.066 <i>a</i>	72.46± 5.59 <i>bc</i>	1051± 109 <i>b</i>	2.926± 0.054 <i>a</i>	30.73± 3.22 <i>b</i>	0.39± 0.01 <i>a</i>
N7	4637± 270 <i>a</i>	2.086± 0.043 <i>b</i>	96.73± 6.10 <i>ab</i>	1828± 90 <i>a</i>	2.549± 0.074 <i>b</i>	46.58± 2.49 <i>a</i>	0.44± 0.02 <i>a</i>
N10	4822± 375 <i>a</i>	2.242± 0.113 <i>ab</i>	108.79± 12.77 <i>a</i>	1944± 179 <i>a</i>	2.489± 0.097 <i>b</i>	48.72± 5.79 <i>a</i>	0.43± 0.02 <i>a</i>

Interestingly, the two groups of treatments described for plant [N] stood out for the agronomic variables of grain yield, grain N concentration (grain [N]) and total grain N. There were no significant differences in grain yield either between N1 and N4 (690, 1051 g m⁻², respectively) or between N7 and N10 (1828 and 1944 g m⁻², respectively). Probably due to the semi-hydroponic growth conditions, grain yields were high (equivalent to 69 and 194 q ha⁻¹ for the two extreme treatments). Grain [N] values were 3.1 and 2.9 %DW for N1 and N4, respectively and 2.5 %DW for N7 and N10, respectively. There were strong and highly significant opposite-going effects of pre-flowering NO₃⁻ treatment on grain yield and grain [N]. Grain yield and grain [N] were therefore negatively correlated (*r*²=0.99, *p*=0.002). Total grain N (Table 4-2 p.81) was lower than total post-flowering N uptake (calculated by difference between total plant N at maturity, Table 4-2 p.81, and total plant N at flowering, Table 4-1 p.80), indicating that there was no net remobilisation of N from vegetative parts to the grains under our semi-hydroponic conditions. Harvest index lay between 0.39 and 0.44, which is close to values commonly observed under field conditions.

Starting from significantly different levels of plant [N] at flowering, plants from the four [NO₃⁻] treatments quickly converged showing comparable [N] by GS65+300DD (Figure 4-1 p.82). Convergence occurred between flowering and GS65+300DD, and led to plant [N] values between approximately 2.1 and 2.5 %DW for all treatments. Interestingly, the

convergence between treatments was reflected not only in an increase in plant [N] in the low-N pre-flowering treatments (N1 and N4) but also in a decrease in the high-N pre-flowering treatments (N7 and N10). During this phase, plants from N1 and N4 exhibited [N] increases of 59 and 20%, respectively, while plants from N7 and N10 exhibited [N] decreases of 13 and 18%, respectively. From GS65+300DD until maturity, plant [N] remained relatively stable for all treatments, varying between 2.0 and 2.7 %DW.

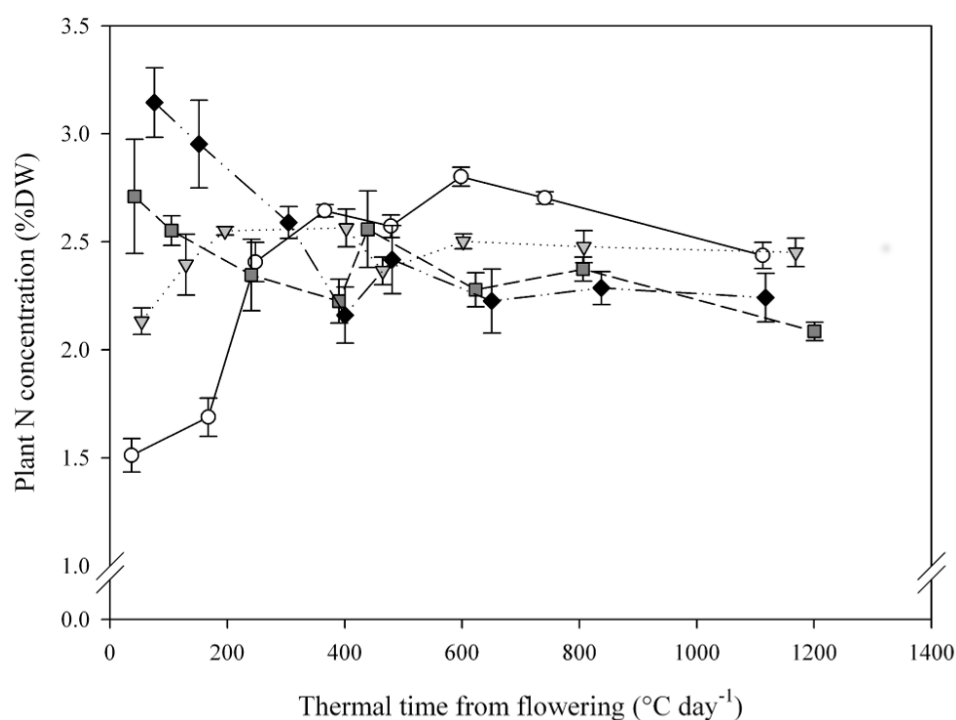


Figure 4-1 : Plant N concentration dynamics during the post-flowering period for the four NO_3^- treatments. Values are the means of four biological repetitions ± 1 standard error for N1 (open circles), N4 (grey triangles), N7 (dark grey squares) and N10 (black diamonds).

4.2. NO_3^- uptake during the post-flowering period

The ^{15}N pulse labelling allows precise measurement of the dynamics of plant NO_3^- uptake during the post-flowering period. Figure 4-2A (p.83) shows that all treatments had strong NO_3^- uptakes at flowering, with levels between 0.36 and $1.08 \text{ gNO}_3^- \text{ m}^{-2}\text{day}^{-1}$ depending on $[\text{NO}_3^-]$ treatment. After flowering and regardless of $[\text{NO}_3^-]$ treatment, NO_3^- uptake showed a rapid decrease from flowering until a date between GS65+300DD and GS65+400DD where uptake stopped. NO_3^- uptake then recovered rapidly to a substantial level between 0.2 and $0.5 \text{ gNO}_3^- \text{ m}^{-2}\text{day}^{-1}$ depending on $[\text{NO}_3^-]$ treatment and then slowly declined until maturity. In addition to NO_3^- uptake dynamics, these results also show that NO_3^- uptake continued until late during the post-flowering period when plants were exposed to a non-limiting level of NO_3^- in the nutrient solution.

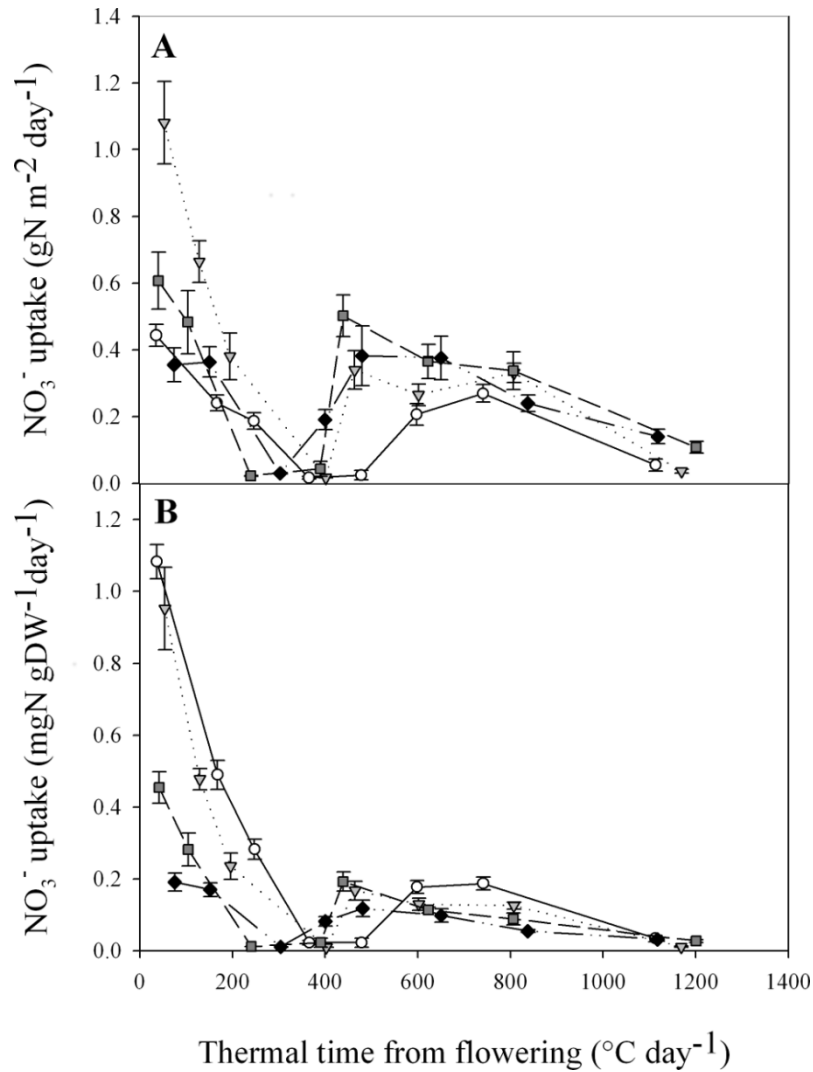


Figure 4-2 : Plant NO_3^- uptake dynamic during post-flowering period for the four NO_3^- treatments per square meter (A) or per unit DW (B). Data were obtained by substitution of the previous nutrient solution by an identical one but labelled 10% ^{15}N nutrient solution 24 h before sampling. Values are the means of eight biological repetitions \pm 1 standard error for N1 (open circles), N4 (grey triangles), N7 (dark grey squares) and N10 (black diamonds).

When NO_3^- uptake is normalised to plant DW, it is easier to interpret differences in NO_3^- uptake between the four $[\text{NO}_3^-]$ treatments (Figure 4-2B p.83). Although in terms of temporal dynamics, NO_3^- uptake looks very similar either in absolute terms (Figure 4-2A p.83) or when normalised by DW (Figure 4-2B p.83), the latter representation shows that plants from N1 had strong NO_3^- uptakes per unit DW (Figure 4-2B p.83). As expected, NO_3^- uptake was strongly impacted by plant N status at flowering. Also at flowering, NO_3^- uptake per unit DW was considerably larger for plant exposed to the low $[\text{NO}_3^-]$ treatments pre-flowering. Relative to N10, daily fluxes of NO_3^- uptake were 5.7-, 5- and 2.4-times higher for N1, N4 and N7, respectively. Furthermore, the normalisation of NO_3^- uptake per unit DW allows

better comparisons of the different periods of the temporal dynamic. Indeed, the direct effect of NO_3^- uptake on plant $[\text{N}]$ was much stronger at flowering than later during the post-flowering period (Figure 4-2B p.83). Lastly, the exact stage of NO_3^- uptake recovery seems to differ between the $[\text{NO}_3^-]$ treatments. The most obvious trend is that plants exposed to higher pre-flowering $[\text{NO}_3^-]$, restarted uptake earlier than those exposed to lower pre-flowering $[\text{NO}_3^-]$.

4.3. Post-flowering dynamics of $[\text{NO}_3^-]$ and NO_3^- transporter gene expression in roots

The gene expression and NO_3^- concentration measurements were carried out only on N4 and N10 plants because these represent a best compromise between a distinct N effect and non-extreme plant structures. Because of the strong correlation observed between roots and stems $[\text{NO}_3^-]$ dynamic during the post-flowering period ($r^2=0.695$, $p<0.0001$) (S4 Fig, Annex 1), and because flag leaves were not impacted by NO_3^- treatment (S5 Table, Annex 1), the results presented in this section are based on root samples only. This specific focus on roots for $[\text{NO}_3^-]$ was chosen to improve results clarity, given that roots and stems bring redundant information, and flag leaves seemingly bring no information on the differences on plant N status observed in the present study. Results from stems and flag leaves are however available as supplementary data (S6 Fig, Annex 1).

Levels of root $[\text{NO}_3^-]$ at flowering were strongly impacted by NO_3^- treatment (Figure 4-3 p.85). Indeed, at flowering, N4 plants exhibited root $[\text{NO}_3^-]$ of $29.1 \mu\text{mol gFW}^{-1}$ whereas in N10 plants $[\text{NO}_3^-]$ was 2.6-times higher ($77.8 \mu\text{mol gFW}^{-1}$). After flowering, the two treatments rapidly converged to around $80 \mu\text{mol gFW}^{-1}$ after about 300DD. Despite some variability between sampling dates, $[\text{NO}_3^-]$ remained relatively stable thereafter. The rapid convergence of root $[\text{NO}_3^-]$ between the two treatments was caused mainly by a near doubling of $[\text{NO}_3^-]$ in N4 during the 200 DD immediately following flowering (Figure 4-3 p.85). The levels of $[\text{NO}_3^-]$ in the roots were not significantly related to NO_3^- uptake (data not shown).

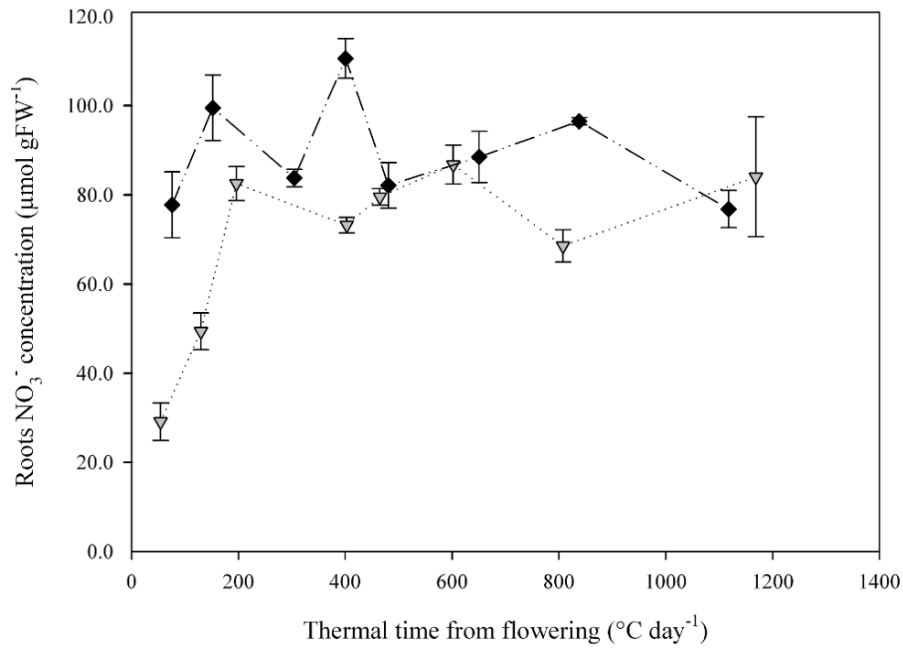


Figure 4-3 : Roots NO₃⁻ concentration dynamics during the post-flowering period for two contrasting NO₃⁻ treatments (N4 and N10). Values are the means of four biological repetitions \pm 1 standard error for N4 (grey triangles) and N10 (black diamonds).

In the two members of the main families of low and high affinity NO₃⁻ transporters, *TaNRT1* and *TaNRT2.1*, post-flowering gene expression dynamics provides valuable information that increases our understanding of NO₃⁻ uptake. For *TaNRT2.1*, the relative expression level at flowering depended on the pre-flowering NO₃⁻ treatment (Figure 4-4A p.86) with its expression in N4 roots being twice that in N10 roots. Both treatments then exhibited a sharp decrease in expression of root *TaNRT2.1* between flowering and GS65+200DD. After that, the difference in expression between the two treatments became small, both showing an increase after 200DD and a further decrease between GS65+400DD and GS65+600DD. The last measurement point shows an unexpected increase in *TaNRT2.1* expression for both treatments but the more pronounced increase in N4 led to significant differences between N4 and N10.

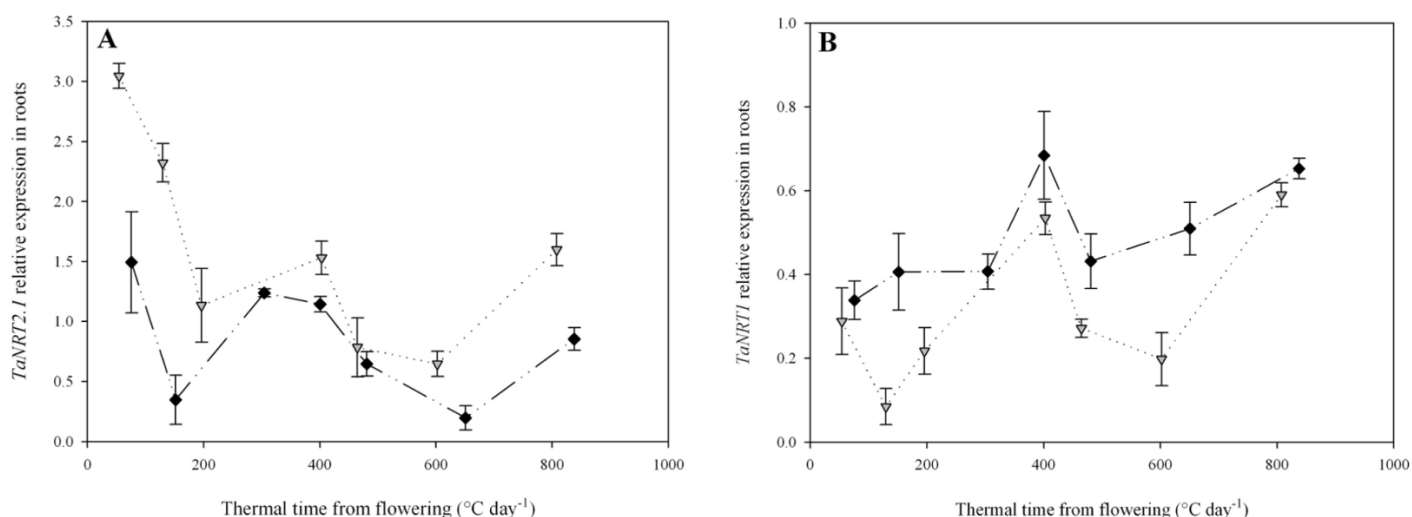
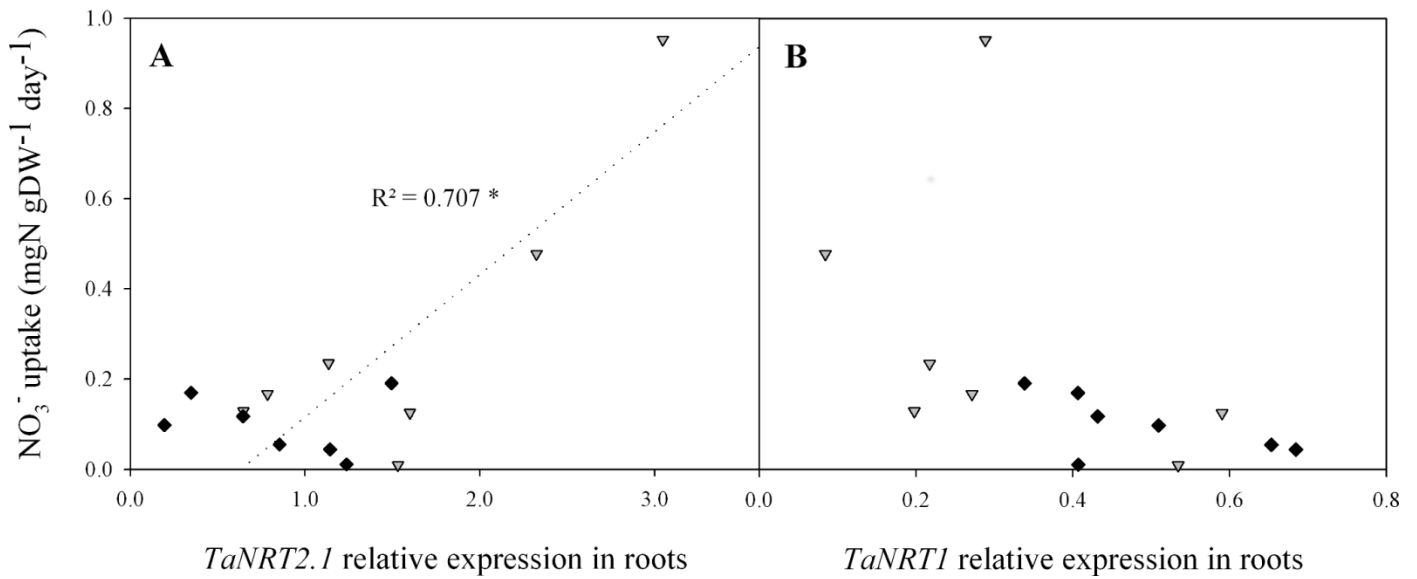


Figure 4-4 : Relative expression patterns of *TaNRT2.1* (A) and *TaNRT1* (B) genes in roots from flowering (GS65) to GS65+800DD for two contrasting NO₃⁻ treatments (N4 and N10). Values are the means of three biological repetitions \pm 1 standard error for N4 (grey triangles) and N10 (black diamonds). Quantification was performed by qRT-PCR. Relative expression values were calculated using the Δ CT method corrected for primer efficiency, using *Ta54280* and *Ta54948* as internal controls.

The relative expression dynamics of *TaNRT1* in roots (Figure 4-4B p.86) differed from that of *TaNRT2.1*. First, expression of *TaNRT1* was low at flowering with no significant difference in relative expression levels between N4 and N10 at that time. After that, expression in N4 plants was consistently lower than in N10 plants, except at GS+400. Second, the expression patterns between the two genes are extremely different, with *TaNRT1* showing an increase in expression from flowering to GS65+400DD and then a decrease which was more pronounced in N4 than in N10. This was followed by an increase during the final measurement period in N4 which came into balance with expression in N10.

The level of NO₃⁻ uptake per unit DW was significantly and positively correlated with *TaNRT2.1* expression in N4 ($r^2=0.707$, $p=0.018$; Figure 4-5A p.87) but not in N10 ($r^2=0.011$). The variation in both variables was extremely small in the latter treatment relative to those in N4 plants. Conversely, *TaNRT1* expression was not significantly correlated with NO₃⁻ uptake ($r^2=0.21$ and 0.33 for N4 and N10, respectively; Figure 4-5B p.87).



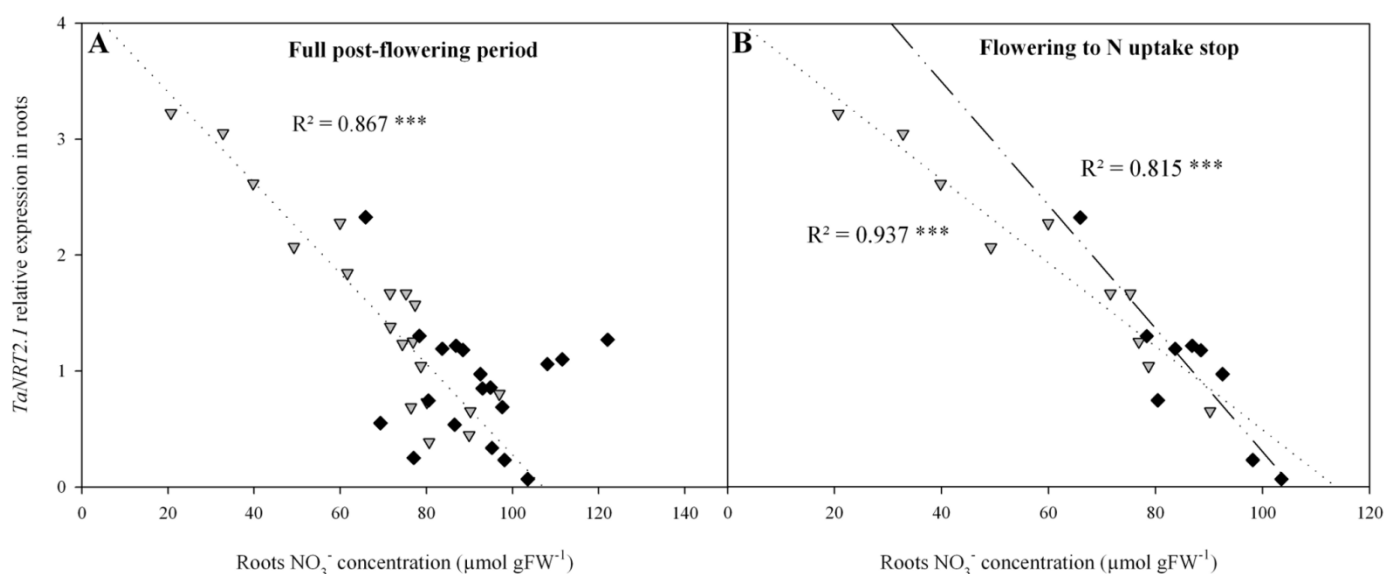


Figure 4-6 : Relations between roots NO_3^- concentration and relative expression level of *TaNRT2.1* in roots for two contrasting NO_3^- treatments (N4 and N10) from flowering (GS65) to GS65+800DD (A) and from flowering (GS65) until NO_3^- uptake stop (respectively GS65+400DD and GS65+300DD for N4 and N10) (B). Values are the three individual biological repetitions for seven post-flowering sampling dates for N4 (grey triangles) and N10 (black diamonds) (A) or respectively four and three sampling dates for N4 and N10 (B). Gene expression quantification was performed by qRT-PCR. Relative expression values were calculated using the ΔCT method corrected for primer efficiency, using *Ta54280* and *Ta54948* as internal controls. Statistical analyses were by the Pearson correlation test.

In order to focus on a developmental phase when the grain sinks for N were weak, the relation between root NO_3^- content and *TaNRT2.1* expression was also observed during the period between flowering and GS65+300DD. Here, the negative relationship between *TaNRT2.1* expression and root $[\text{NO}_3^-]$ was highly significant for both treatments ($r^2=0.94$ and 0.82 for N4 and N10, respectively, Figure 4-6B p.88).

4.4. NO_3^- reduction and assimilation network

To provide a biologically coherent description, correlations between the expressions patterns of the major genes involved in NO_3^- uptake, the reduction and assimilation networks were examined pairwise according to the path of NO_3^- assimilation. Root samples from N4 and N10 were observed independently. In the same way as for $[\text{NO}_3^-]$, results presented for gene expression are based solely on root samples. This specific focus on roots was again retained for clarity, enabled by high positive correlations ($0.61 < r < 0.81$) observed between roots and flag leaves for all observed genes except *TaNADH-GOGAT* (S7 Fig, Annex 1).

Expression dynamics in stems during the post-flowering period were however correlated to those observed in roots for *TaNR* only (S8 Fig, Annex 1).

There was a significant positive correlation between the expression patterns of the high-affinity NO_3^- transporter family member *TaNRT2.1* and the nitrate reductase *TaNR* in both N4 and in N10 in roots (Figure 4-7A p.90). The lower r^2 observed for N10 is explained mainly by the three outliers. Conversely, there was no obvious link between the expression of the low-affinity NO_3^- transporter family member *TaNRT1* and *TaNR* either in N4 or in N10 (Figure 4-7B p.90). Subsequently, there was a strong positive correlation between *TaNR* and the nitrite reductase (*TaNiR*) expression patterns (Figure 4-7C p.90). Correlations were significant in both N4 and N10 between these two contributors to N reduction. Continuing to follow the path of N in the plant, significant positive correlations were observed between the expressions of *TaNiR* and glutamine synthetase 2 gene (*TaGS2*) in the two treatments (Figure 4-7D p.90). Lastly, correlations were observed between the expressions of *TaGS2* and two forms of glutamine oxoglutarate aminotransferase (*GOGAT*) - ferredoxin-dependent *GOGAT* (*TaFd-GOGAT*; Figure 4-7E p.90) and NADH-dependent *GOGAT* (*TaNADH-GOGAT*; Figure 4-7F p.90). At this level of N assimilation, expression patterns were positively and significantly correlated both in N4 and N10. The overall observation of correlations between the relative expression patterns of all these central network genes suggests a coordinated regulation of nitrogen metabolism with, probably, a limited involvement of *TaNRT1* under our experimental conditions.

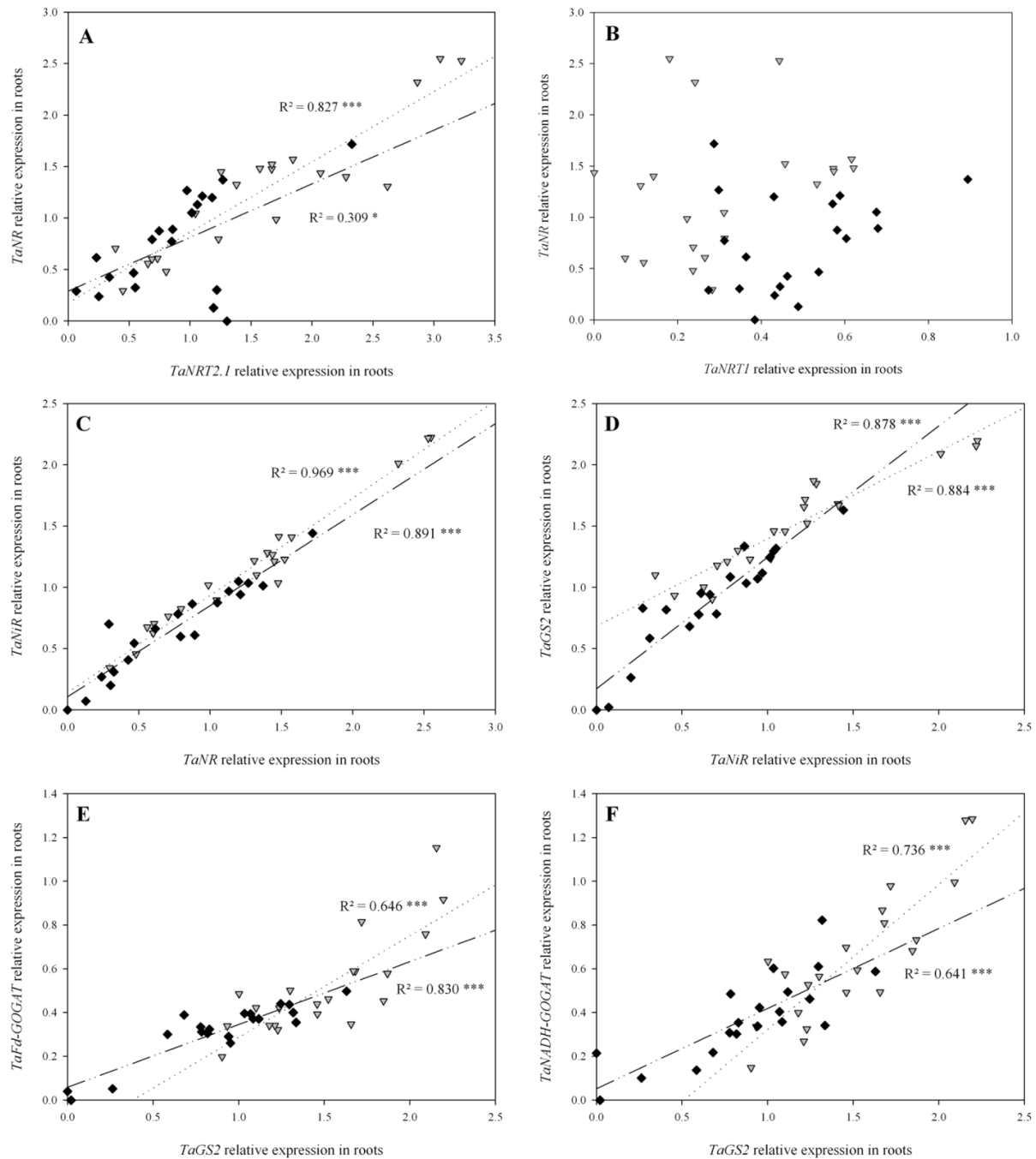


Figure 4-7 : Correlations between relative expression patterns of the main genes involved in NO_3^- uptake, reduction and assimilation in roots from flowering (GS65) to GS65+800DD for two contrasting NO_3^- treatments (N4 and N10). Values originate from seven post-flowering sampling dates, each including three individual biological repetitions for N4 (grey triangles) and N10 (black diamonds). Relations are for (A) *TaNRT2.1* and *TaNR*, (B) *TaNRT1* and *TaNR*, (C) *TaNR* and *TaNiR*, (D) *TaNiR* and *TaGS2*, (E) *TaGS2* and *TaFd-GOGAT*, and (F) *TaGS2* and *TaNADH-GOGAT*. Quantification was performed by qRT-PCR. Relative expression values were calculated using the ΔCT method corrected for primer efficiency, using *Ta54280* and *Ta54948* as internal controls. Statistical analyses were by the Pearson correlation test.

V Discussion

The objectives of this study were to provide a detailed vision of post-flowering N uptake and to identify possible control mechanisms, using a prospective approach based on correlations between physiological traits, NO_3^- uptake, NO_3^- concentrations and expression level of key genes of the N metabolism. Clearly, the present work does not provide any functional dissection of the interaction between these physiological processes but highlights strong correlations between variables during post-flowering N uptake on wheat plants in realistic conditions in term of plant size, canopy structure and grain sink strength.

To achieve this, wheat plants were grown under four pre-flowering NO_3^- treatments to create contrasting N statuses at flowering and monitor post-flowering NO_3^- uptake under non-limiting NO_3^- conditions. Results show that NO_3^- uptake occurred until late grain filling. N status influenced NO_3^- uptake rates at flowering and all treatments converged rapidly towards comparable levels of NO_3^- uptake. Treatment differences in [N] at flowering decreased considerably under non-limiting NO_3^- conditions. NO_3^- uptake rate was correlated with *TaNRT2.1* expression, which in turn was correlated with *TaNR* expression. The main components of the gene network involved in NO_3^- uptake, NO_3^- reduction and N assimilation showed coordinated patterns of expression. Root $[\text{NO}_3^-]$ levels were negatively correlated with *TaNRT2.1*, indicating that NO_3^- could be a regulating element for *TaNRT2.1* expression and, so also of NO_3^- uptake. Here, we will discuss: (i) the experimental conditions; (ii) the control of post-flowering NO_3^- uptake; (iii) the putative impact of *TaNRT2.1* on NO_3^- uptake and its putative regulation; and (iv) possible limiting factors for grain [N] under extreme conditions of NO_3^- availability.

5.1. Evaluation of growing conditions

Growing wheat in controlled hydroponic conditions allows nutrient availability to be closely regulated. Nevertheless, it is difficult to obtain nutrient availabilities fully comparable with those under field conditions. Previous studies [14–17,54] have developed fertilisation protocols for use in hydroponic culture that allow field N conditions to be mimicked with constant availability of growth-limiting levels of N. Here, a more classical approach was used to drive growth during the pre-flowering period. This involved four distinct NO_3^- treatments and generated canopies of markedly contrasting structure. The level of $[\text{NO}_3^-]$ in the nutrient solutions strongly influenced pre-flowering plant development, with increments of $[\text{NO}_3^-]$ increasing tiller density linearly by about 90 tillers $\text{m}^{-2}\text{mM}^{-1}$, biomass by about 140g $\text{m}^{-2}\text{mM}^{-1}$ and [N] by 0.2 percentage points mM^{-1} .

A further objective of the experimental setup was to apply NO_3^- at excess levels during the post-flowering period in order to study the effects of N status at flowering on NO_3^- uptake under non-limiting conditions. Although 10 mM $[\text{NO}_3^-]$ in a nutrient solution is usually considered to be non-limiting for growth in *Arabidopsis* [21,55,56], and is usually the highest level N treatment in hydroponic wheat [36,57], it is difficult to be certain that this level was strictly non-limiting as we did not include treatments with even higher levels of [N]. Barneix [58] stated in a review that high N uptake rates, lead to high levels of N nutrition, but they

inhibit leaf senescence and the remobilisation of N to the grain. In our study, the absence of significant net remobilisation of N from vegetative parts during the post-flowering period (the amount of N taken up was higher than the total in the grain for all treatments) suggests that NO_3^- was indeed available in a sufficient quantity. This scenario differs from the 60 to 95% of N remobilisation usually observed in the field [8,11,13].

Therefore, it seems reasonable to infer that the NO_3^- treatments used here led not only to highly contrasting stands at flowering but they further allowed the post-flowering growth to be non-limiting with regard to NO_3^- .

5.2. Post-flowering control of NO_3^- uptake

Under our semi-hydroponic, non-limiting NO_3^- conditions, plants exhibited positive NO_3^- uptake until late in grain filling. Similar observations have been reported for barley cultured hydroponically under N-limiting conditions [15] and for wheat [14,16,17,54], as well as for wheat under semi-controlled conditions, more similar to the field [59]. In these studies, N uptake also occurred until close to grain maturity, showing that these plants do not have an intrinsic physiological incapacity to take up N during grain filling. Compared to the NO_3^- uptake rates in the present study, the lower rates generally observed in the field are thus unlikely related to an intrinsic incapacity of the plant but instead to some unfavourable conditions that affect either the availability of N in the soil or the plant's demand for it.

In their hydroponic study on wheat, Oscarson *et al.* [16] showed that under N-limiting conditions, N uptake gradually decreases throughout the post-flowering period. However, under non-limiting conditions, we show that NO_3^- uptake is far from constant from flowering to maturity. This leads to the hypothesis that NO_3^- uptake is regulated by factors other than NO_3^- availability. Information on N uptake dynamics in wheat under non-limiting conditions is scarce, particularly during the post-flowering period. Both Imsande and Touraine [60], and Feil [22] in a review based on both controlled conditions and field experiments hypothesised that N uptake reflects the internal demand of the crop and is not determined only by the external [N]. This idea also finds support in some more recent experimental studies [61,62] as well as in assessments of N uptake arising from wheat crop simulation models. These models, despite some calculation differences, calculate N uptake as governed by a balance between the plant's needs to support growth and the availability of N in the soil [63]. Thus, under non-limiting N conditions, N uptake is potentially fully governed by the plant's demand for N for growth.

If the present study confirms earlier findings on post flowering N uptake in wheat, it also provides a clearer view of the small-scale dynamics of the process. Post-flowering NO_3^- uptake dynamics can be divided into three distinct phases. The first of these is from flowering to sometime between GS65+300DD and GS65+400DD (depending on treatment). Here NO_3^- uptake declines considerably from its level at flowering. Next, in the second phase, NO_3^- uptake almost ceases for a period of about 100DD. And last, in the third phase, a recovery of NO_3^- uptake occurs which persists to maturity. Interestingly, each phase coincides with a

physiological evolution in development, supporting the idea that NO_3^- uptake could be strongly controlled by a growth demand for N.

The general decline in NO_3^- uptake during the first phase is synchronous with a reduction in the sink strength of plant growth. Indeed, immediately after flowering, there are few new sinks for N as the photosynthetic apparatus is already fully developed, whereas the spikes are not yet into a phase of rapid biomass increase. The main biomass increment occurring during this phase is driven by post flowering stem elongation. The stem is a structural tissue that is relatively poor in N compared with, say, a leaf. Both the upper internode and the ear peduncle are known to continue extension for approximately one week after anthesis [64]. Although a common tendency in NO_3^- uptake decrease was observed after flowering in the four NO_3^- treatments, there were quite marked differences in NO_3^- uptake levels between treatments. Thus, immediately after flowering when NO_3^- availability became non-limiting, NO_3^- uptake ranked inversely with the level of pre-flowering NO_3^- treatment. Also, NO_3^- uptake rate at flowering and its dynamics during the first phase immediately afterwards, are in line with a convergence towards a common value for [N]. This observation supports the idea that NO_3^- uptake could be regulated also by plant N status. The high levels of NO_3^- uptake at this time observed in the low- NO_3^- treated plants, was associated with an increase in total plant [N] and this mainly through N enrichment of the existing organs. This phenomenon is a familiar response of plants re-supplied with N after a period of N starvation. Under such conditions increased N uptake rates have been reported in both wheat [65] and barley [24]. Furthermore, the plant [N] convergence between treatments was not due solely to increased plant [N] in the low- NO_3^- treatments but also to decreased plant [N] in the high- NO_3^- treatments. This was linked mainly with a greater increase in stem biomass in the high- NO_3^- treatments than in the low- NO_3^- treatments (data not shown). The latter was probably because of a higher cover density resulting in more light competition among the plants [52]. Because stems are poorer in N than leaves, the relative change in proportion between leaf and stem coupled with a low NO_3^- uptake rate resulted in a decrease in [N] at the whole plant level.

In contrast to the observations of Oscarson *et al.* [16], NO_3^- uptake in our study stopped completely for a period of about 100 °Cdays around GS65+300DD to GS65+400DD. Physiologically, this phenomenon coincided with the absence of a significant sink for N. This is because the vegetative parts of the plant were fully developed, while the reproductive parts (the grains) had not yet started active filling. Furthermore, plant [N] was already extremely high at this stage in all treatments.

Still in agreement with the hypothesis of the control of N uptake by the N growth demand, the NO_3^- uptake resumed when the grains started to fill. If grain storage protein filling starts around GS65+240DD, then its maximal rate occurs from about GS65+300DD to GS65+600DD [66]. In absence of any net N remobilisation from the vegetative parts, this phase of renewed NO_3^- uptake was the main source of N for grain filling. Using ^{15}N pulse labelling in a hydroponic study, Oscarson *et al.* [17] showed that where N was limiting, a temporary increase in NO_3^- availability late during grain filling resulted in a preferential allocation of newly-assimilated N to the grain. The authors concluded that ^{15}N taken up during grain filling was rapidly incorporated in the mobile N pool of the plant and was allocated partly to tissue maintenance but mainly to grain filling. Surprisingly, our different

treatments which resulted in highly-contrasting grain yields instead had closely-similar NO_3^- uptake rates during this third phase. This suggests that NO_3^- uptake was slowed in the high- NO_3^- treatments although these, at least potentially, had greater sink demand for N. As NO_3^- was in excess, the ability of plants to assimilate N probably reached its limits under such extreme conditions.

5.3. Relationships between plant NO_3^- uptake and the expression of N metabolism genes

The relative expressions of the seven main genes involved in NO_3^- uptake and N assimilation were followed for the N4 and N10 treatments. These genes are hypothesised to be representative of N network activity and composed of genes coding NO_3^- transporters, and key enzymes involved in NO_3^- reduction and assimilation. Relative expression dynamics were followed in the roots during the post-flowering period with the double purpose (a) of better understanding their behaviour and interrelationships for plants of different N status under non-limiting conditions, and (b) of observing the relationship between ^{15}N -based measurements NO_3^- uptake and the expression the N network genes. Although the results presented here for genes expression were focused on root samples, the conclusions of the study should not be biased for two main reasons. Firstly, a large part of N reduction and assimilation occurs in roots during grain filling in wheat (60 to 75 % depending on N fertilization level) [67]. Secondly, the high positive correlations observed for all studied genes between roots and flag leaves (S7 Fig, Annex 1), except *TaNADH-GOGAT*, suggest that NO_3^- reduction and assimilation processes could be subjected to a common regulation in these two major organs for N metabolism.

The significant correlation between NO_3^- uptake and *TaNRT2.1* relative expression in N4 plants during the post-flowering period suggests an important role for this high-affinity nitrate transporter in NO_3^- uptake. Nevertheless, the absence of a correlation in N10 plants, suggests that the relation is not linear at constant high NO_3^- availability. Conversely, no correlation between NO_3^- uptake and *TaNRT1* relative expression could be detected, suggesting a limited role for this gene under our conditions. Moreover, our results show that *TaNRT2.1* is expressed at higher levels than *TaNRT1* despite the high $[\text{NO}_3^-]$ (10 mM) in the nutrient solution. Comparable results have been found in *Arabidopsis* grown in 10 mM NO_3^- supplied for 5 min with 6 mM NO_3^- , where *AtNRT2.1* was expressed at higher levels than *AtNRT1.1* both in the plant's vegetative and reproductive stages [21]. Similarly, in maize, *ZmNRT2.1* and *ZmNRT2.2* were expressed at higher levels than *ZmNRT1.1* and *ZmNRT1.2* throughout the life cycle with both 0.5 and 2.5 mM NO_3^- , and *ZmNRT2.1* expression patterns showed strong similarities to the N uptake dynamic [40]. In wheat, Wang *et al.* [36] also showed that *TaNRT2.1* is always expressed at higher levels than *TaNRT1* in NO_3^- ranges comparable to ours. These results suggest that *TaNRT2.1* participates in NO_3^- uptake in a substantial way, even at high $[\text{NO}_3^-]$.

Corroborating correlations with NO_3^- uptake, *TaNRT2.1* relative expression also correlated with *TaNR* relative expression in roots (Figure 4-7A p.90) as well as in flag leaves (S9 Fig, Annex 1). The presumed major role of *TaNRT2.1* in post-flowering NO_3^- uptake is supported

by its consistent expression dynamics with the rest of the network. Conversely, the expression dynamics of *TaNRT1* was not correlated with *TaNRT2.1* and, therefore neither with the rest of the network. *TaNRT2.1* thus appears to have a major role in NO_3^- uptake, especially during periods of rapid uptake under non-limiting NO_3^- conditions. However, the correlation between expression and uptake was not perfect, suggesting that *TaNRT2.1* is complemented by other NO_3^- transporters operating under a different control mechanism.

Regulation of NO_3^- transporters is a key factor for understanding NO_3^- uptake and NO_3^- assimilation. Several hypotheses have been proposed for the regulation of the NRT2 gene family by internal feedback. According to literature sources, putative inhibitory signals are NO_3^- [24–26] or circulating amino acids such as glutamine [27,28]. Under our conditions, *TaNRT2.1* expression was clearly negatively correlated with $[\text{NO}_3^-]$ in roots, suggesting a negative feedback exerted by the root NO_3^- level. According to this hypothesis, during plant growth, N demand exercised by newly-formed N sinks could limit NO_3^- accumulation in roots, thus allowing the maintenance or increase of *TaNRT2.1* expression. Decreases in N sink strength could lead to $[\text{NO}_3^-]$ increases in the roots, resulting in *TaNRT2.1* repression, and NO_3^- uptake decrease. This hypothesis for NO_3^- uptake regulation fits with the assumption that NO_3^- uptake is controlled by plant growth rate under non-limiting conditions.

Study of the relative expressions of the key N network genes reveals their apparent common regulation during post-flowering period, with strong correlations between the various components. Root $[\text{NO}_3^-]$ would seem to be a good candidate for the role of transmitting the plant N status signal to the NO_3^- transporters. Although relative gene expression studies should be complemented by enzymatic activity assays, because additional regulation may occur at the post-transcriptional level, such as for NR [68], cytosolic GS1 [69], or the root ammonium transporter AMT1.1 [70], our results still seem to indicate a major role for *TaNRT2.1* transporter in post-flowering NO_3^- uptake under non-limiting NO_3^- conditions. Plants have shown the ability to quickly regulate their [N] under non-limiting NO_3^- conditions when previously NO_3^- starved, coinciding with increases in the relative expressions of key N metabolism genes. It is possible that this approach may allow identification of genetic variability in the ability to quickly assimilate NO_3^- when NO_3^- is available. A large capacity for NO_3^- assimilation during short favourable periods during the post-flowering growth phase may be a determinant element for increasing grain [N].

5.4. Hypotheses for grain N content limitation

The main justification of studying the physiological basis of post flowering N uptake is its strong link with wheat grain [N], a major agronomic trait. Following the work of Monaghan *et al.* [6], Bogard *et al.* [8] demonstrated that genetic variability in grain [N] was strongly related to post-flowering N uptake capacity, regardless of plant N status at flowering. Thus, one objective of this work was to open tracks in the understanding of the complex regulations of post-flowering N uptake and N assimilation.

Here, high levels of grain yield were associated with decreased grain [N]. This observation is classic, since it is the basis of the extremely well known negative relationship between

grain yield and grain protein [4,22,71]. It is, however, less intuitive under our conditions of non-limiting NO_3^- availability during grain filling.

In an ear-halving experiment with four cultivars of contrasting yield potential, Martre *et al.* [72] showed that grain [N] was mainly source-limited as grain [N] increased in halved ears, and as grain N per ear was nearly constant. More precisely, they stated that if yield is clearly limited by sink size, then their ear-halving experiment suggests that grain N filling is relatively more limited by N source. Following this hypothesis, several potential processes limiting N grain filling can be identified, from root N uptake to protein synthesis within the grain, passing through N assimilation and N transport to ears. Our study suggests that NO_3^- uptake can reasonably be dismissed from this series, because of the high post-flowering availability of NO_3^- . In addition the results obtained by Oscarson *et al.* [16] show that intrinsic root N uptake capacity was never a limiting factor under hydroponic conditions. Grain protein synthesis capacity and N transport into the ear can also be eliminated. First, there is no obvious reason for a higher capacity for protein synthesis in grains under a low- NO_3^- treatment than in those under a high- NO_3^- treatment, based on the fact that in our study, the grains of the four treatments had comparable individual masses (S10 Table, Annex 1). Second, using wheat ears grown in liquid culture, Barlow *et al.* [73] show that ear capacity to transport N compounds and grain capacity to synthesise protein were not limiting elements. This is supported by the conclusions of Martre *et al.* [72] which state that the capacity of the sink to synthesise proteins does not regulate grain N accumulation. We therefore conclude that, the most likely hypothesis to explain the decrease in grain [N] with increasing yield, is a limitation operating at the level of N assimilation, with a possible saturation of the assimilation pathway.

In our study, increased grain yield was principally related to higher grain numbers per square meter (S10 Table, Annex 1), and these were mainly conditioned by pre-flowering NO_3^- availability. Grain growth rate has been shown to be independent of N availability [74]. The independence between grain development and N availability implies that N demand by the grain during the post-flowering period depends mainly on a plant yield potential established before flowering and therefore varies with the availability of N before flowering. Thus, plants from the low- NO_3^- treatments developed a relatively small yield potential, and filled a low number of grains under later high- NO_3^- conditions after flowering. Conversely, plants from the high- NO_3^- treatments developed a relatively high yield potential, and filled a higher number of grains under the later high- NO_3^- conditions. In the latter case, this necessarily implies a reduced share of available N per grain, thus leading to lower grain [N].

Our results do not allow a precise conclusion regarding the main metabolic process(es) responsible for source limitation. Nevertheless, Jenner *et al.* [75] proposed that a single, or a few, of the amino-acids necessary for grain protein synthesis may limit the global N flux to the grain. For example proline is a major component of storage proteins but represents only a small fraction of the total amino-acid pool in the plant and this can be limiting. In addition, Howarth *et al.* [74] showed that glutamine was the principal amino acid accumulated in the grain, and that its accumulation occurred in the first seven days of grain filling. It may therefore be hypothesised that this key amino-acid may be limiting in the context of a strong demand over a short period of time.

VI Conclusion

This study based on a semi-hydroponic culture in controlled conditions of wheat cv. Récital shows that post-flowering NO_3^- uptake is controlled by N status at flowering in early stages following flowering. Latter in the cycle, during the active grain development phase, NO_3^- uptake appeared to be regulated by N demand for growth, although this study did not allow to functionally demonstrate this hypothesis. *TaNRT2.1* seems to play a major role in NO_3^- uptake, with expression patterns in both N4 and N10 treatments that were positively correlated with those of the main genes involved in NO_3^- reduction and assimilation. This study also shows that root $[\text{NO}_3^-]$ could play an important role in the regulation of *TaNRT2.1* expression. These findings were obtained on wheat plants at a developmental stage and with a canopy structure that are both meaningful for the underlying agronomic question asked. We believe these results form a good working basis for future research on genetic variability associated with the control of post-flowering N uptake with a long-term goal of forcing a break in the negative relationship between grain protein and grain yield.

VII Acknowledgements

The authors thank Bernard Bonnemoy and Joelle Messaoud (INRA Clermont-Ferrand) for their technical assistance and Bertrand Hirel (INRA Versailles) for his useful comments on the manuscript. Sandy Lang (rescript.co.nz) proofread and provided language assistance.

References

1. Branlard G, Dardevet M, Saccomano R, Lagoutte F, Gourdon J. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica*. 2001;119: 59–67.
2. Shewry PR. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J Cereal Sci*. 2007;46: 239–250.
3. Simmonds NW. The relation between yield and protein in cereal grain. *J Sci Food Agric*. 1995;67: 309–315.
4. Oury F-X, Godin C. Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica*. 2007;157: 45–57.
5. Rothstein SJ. Returning to our roots: making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *Plant Cell*. 2007;19: 2695–2699.
6. Monaghan JM, Snape JW, Chojecki AJS, Kettlewell PS. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica*. 2001;122: 309–317.
7. Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Pluchard P, Rousset M, et al. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program [*Triticum aestivum* L.]. *J Genet Breed*. 2003;57.
8. Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J-M, Jeuffroy M-H, et al. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *J Exp Bot*. 2010;61: 4303–4312.
9. Cox MC, Qualset CO, Rains DW. Genetic variation for nitrogen assimilation and translocation in wheat. III. Nitrogen translocation in relation to grain yield and protein. *Crop Sci*. 1986;26: 737–740.
10. Palta JA, Kobata T, Turner NC, Fillery IR. Remobilization of carbon and nitrogen in wheat as influenced by postanthesis water deficits. *Crop Sci*. 1994;34: 118–124.
11. Van Sanford DA, MacKown CT. Cultivar differences in nitrogen remobilization during grain fill in soft red winter wheat. *Crop Sci*. 1987;27: 295–300.
12. Palta JA, Fillery IRP. N application enhances remobilization and reduces losses of pre-anthesis N in wheat grown on a duplex soil. *Aust J Agric Res*. 1995;46: 519–531.
13. Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Res*. 2007;102: 22–32.
14. Oscarson P. The strategy of the wheat plant in acclimating growth and grain production to nitrogen availability. *J Exp Bot*. 2000;51: 1921–1929.
15. Mattsson M, Lundborg T, Larsson M, Larsson C-M. Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth III. Post-anthesis kinetics of net nitrate uptake and the role of the relative root size in determining the capacity for nitrate acquisition. *J Exp Bot*. 1992;43: 25–30.
16. Oscarson P, Lundborg T, Larsson CM. Genotypic differences in nitrate uptake and nitrogen utilization for spring wheat grown hydroponically. *Crop Sci*. 1995;35: 1056–1062.
17. Oscarson P, Lundborg T, Larsson M, Larsson C-M. Fate and effects on yield components of extra applications of nitrogen on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in solution culture. *Plant Soil*. 1995;175: 179–188.
18. Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM. Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot*. 2007;58: 2297–2306.
19. Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett*. 2007;581: 2290–2300.
20. Glass ADM. Nitrate uptake by plant roots. *Botany*. 2009;87: 659–667.
21. Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot*. 2010;105: 1141–1157.

22. Feil B. The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends Agron.* 1997;1: 103–119.
23. Clarkson DT. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 1985;36: 77–115.
24. Siddiqi MY, Glass AD, Ruth TJ, Rufty TW. Studies of the uptake of nitrate in barley I. kinetics of $^{13}\text{NO}_3$ -influx. *Plant Physiol.* 1990;93: 1426–1432.
25. King BJ, Siddiqi MY, Ruth TJ, Warner RL, Glass AD. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiol.* 1993;102: 1279–1286.
26. Wang R. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2004;136: 2512–2522.
27. Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiol.* 2000;123: 307–318.
28. Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, et al. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2. 1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol Biol.* 2003;52: 689–703.
29. Maathuis FJ. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12: 250–258.
30. Huang N-C, Liu K-H, Lo H-J, Tsay Y-F. Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell Online.* 1999;11: 1381–1392.
31. Liu K-H, Huang C-Y, Tsay Y-F. *CHL1* is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell.* 1999;11: 865–874.
32. Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, et al. Nitrate-regulated auxin transport by *NRT1.1* defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell.* 2010;18: 927–937.
33. Lin C-M, Koh S, Stacey G, Yu S-M, Lin T-Y, Tsay Y-F. Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. *Plant Physiol.* 2000;122: 379–388.
34. Plett D, Toubia J, Garnett T, Tester M, Kaiser BN, Baumann U. Dichotomy in the *NRT* gene families of dicots and grass species. *PLoS ONE.* 2010;5: e15289.
35. Migocka M, Warzybok A, Kłobus G. The genomic organization and transcriptional pattern of genes encoding nitrate transporters 1 (*NRT1*) in cucumber. *Plant Soil.* 2013;364: 245–260.
36. Wang P, Wang Z, Cai R, Li Y, Chen X, Yin Y. Physiological and molecular response of wheat roots to nitrate supply in seedling stage. *Agric Sci China.* 2011;10: 695–704.
37. Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, et al. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol.* 2006;142: 1304–1317.
38. Filleur S, Dorbe M-F, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, et al. An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.* 2001;489: 220–224.
39. Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol.* 2003;44: 304–317.
40. Garnett T, Conn V, Plett D, Conn S, Zanghellini J, Mackenzie N, et al. The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. *New Phytol.* 2013;198: 82–94.
41. Yin L-P, Li P, Wen B, Taylor D, Berry JO. Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other *NRT2* genes. *Plant Sci.* 2007;172: 621–631.
42. Meyer C, Stitt M. Nitrate reduction and signalling. *Plant nitrogen.* Springer Berlin Heidelberg; 2001. pp. 37–59.
43. Lea PJ, Forde BG. The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant Cell Environ.* 1994;17: 541–556. doi:10.1111/j.1365-3040.1994.tb00148.x

44. Boisson M, Mondon K, Torney V, Nicot N, Laine A-L, Bahrman N, et al. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet.* 2005;110: 932–940.
45. Bernard SM, Møller ALB, Dionisio G, Kichey T, Jahn TP, Dubois F, et al. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol.* 2008;67: 89–105.
46. Quraishi UM, Abrouk M, Murat F, Pont C, Foucrier S, Desmaizieres G, et al. Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-metaQTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution: concerted genome evolution of a NUE metaQTL in cereals. *Plant J.* 2011;65: 745–756.
47. Castle SL, Randall PJ. Effects of sulfur deficiency on the synthesis and accumulation of proteins in the developing wheat seed. *Funct Plant Biol.* 1987;14: 503–516.
48. Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, et al. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol.* 2006;142: 1574–1588.
49. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ Quant PCR.* 2004;1: 89–113.
50. Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol.* 2009;10: 11.
51. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. 2012.
52. Lemaire G, Gastal F. N uptake and distribution in plant canopies. *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997. pp. 3–43.
53. Justes E, Mary B, Meynard JM, Machet JM, Thelier-Huche L. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Ann Bot.* 1994;74: 397–407.
54. Oscarson P. Transport of recently assimilated ¹⁵N nitrogen to individual spikelets in spring wheat grown in culture solution. *Ann Bot.* 1996;78: 479–488.
55. Orsel M. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol.* 2002;129: 886–896.
56. Tocquin P, Corbesier L, Havelange A, Pieltain A, Kurtem E, Bernier G, et al. A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 2003;3: 2.
57. Carillo P, Mastrodonato G, Nacca F, Fuggi A. Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. *Funct Plant Biol.* 2005;32: 209–219.
58. Barneix AJ. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *J Plant Physiol.* 2007;164: 581–590.
59. Martre P, Jamieson PD, Semenov MA, Zyskowski RF, Porter JR, Triboi E. Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *Eur J Agron.* 2006;25: 138–154.
60. Imsande J, Touraine B. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 1994;105: 3.
61. Olesen JE, Berntsen J, Hansen EM, Petersen BM, Petersen J. Crop nitrogen demand and canopy area expansion in winter wheat during vegetative growth. *Eur J Agron.* 2002;16: 279–294.
62. Sadras VO, Rodriguez D. Modelling the nitrogen-driven trade-off between nitrogen utilisation efficiency and water use efficiency of wheat in eastern Australia. *Field Crops Res.* 2010;118: 297–305.
63. Jeuffroy MH, Ney B, Ourry A. Integrated physiological and agronomic modelling of N capture and use within the plant. *J Exp Bot.* 2002;53: 809–823.
64. Bertheloot J, Andrieu B, Martre P. Light–nitrogen relationships within reproductive wheat canopy are modulated by plant modular organization. *Eur J Agron.* 2012;42: 11–21.
65. Talouizte A, Guiraud G, Moyse A, Marol C, Champigny ML. Effect of previous nitrate deprivation on ¹⁵N-nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J Plant Physiol.* 1984;116: 113–122.
66. Triboi E. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *J Exp Bot.* 2003;54: 1731–1742.

67. Kirkman MA, Mifflin BJ. The nitrate content and amino acid composition of the xylem fluid of spring wheat throughout the growing season. *J Sci Food Agric*. 1979;30: 653–660.
68. Kaiser WM, Huber SC. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot*. 2001;52: 1981–1989.
69. Finnemann J, Schjoerring JK. Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J*. 2000;24: 171–181.
70. Yuan L, Loque D, Ye F, Frommer WB, von Wiren N. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. *Plant Physiol*. 2006;143: 732–744.
71. Triboi E, Martre P, Girousse C, Ravel C, Triboi-Blondel A-M. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *Eur J Agron*. 2006;25: 108–118.
72. Martre P. Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiol*. 2003;133: 1959–1967.
73. Barlow EWR, Donovan GR, Lee JW. Water relations and composition of wheat ears grown in liquid culture: effect of carbon and nitrogen. *Aust J Plant Physiol*. 1983;10: 99–108.
74. Howarth JR, Parmar S, Jones J, Shepherd CE, Corol D-I, Galster AM, et al. Co-ordinated expression of amino acid metabolism in response to N and S deficiency during wheat grain filling. *J Exp Bot*. 2008;59: 3675–3689.
75. Jenner CF, Ugalde TD, Aspinall D. The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Funct Plant Biol*. 1991;18: 211–226.

Chapitre 5. **Bread wheat grain protein concentration is related to early post-flowering nitrate uptake under putative control of plant satiety level**

François Taulemesse^{1,2,3}, David Gouache³, Yves Gibon⁴, Jacques Le Gouis^{1,2}, Vincent Allard^{1,2}

¹ INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 5 chemin de Beaulieu, F-63100 Clermont-Ferrand, France

² Université Blaise Pascal, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, F-63178 Aubière Cedex, France

³ Arvalis-Institut du Végétal, Station Expérimentale de Boigneville, F-91720 Boigneville, France

⁴ INRA, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, 71 avenue Edouard Bourlaux, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

Corresponding author:

vincent.allard@clermont.inra.fr

Phone: 04.73.62.44.22

Fax: 04.73.62.44.57

I Avant-propos

Le chapitre 4 a posé les bases de la dynamique fine d'absorption d'azote post-floraison, soumise à des régulations exercées à la fois par le statut azoté et par la demande en azote des grains en remplissage. Le transporteur racinaire NRT2.1 semble fortement impliqué dans l'absorption, sous contrôle éventuel de la concentration en nitrate des racines. Nous avons également observé que le réseau de gènes « azote » semblait répondre à une régulation commune dans les racines, mais également à une échelle systémique. Dans ce chapitre 5 axé sur la recherche de variabilité génétique associée au GPD, l'effet de statuts azotés contrastés à floraison sur l'absorption d'azote post-floraison est observé chez des génotypes robustement contrastés pour le GPD. Des traits physiologiques et moléculaires préalablement suivis dans le chapitre précédent sont quantifiés, et leurs relations vis-à-vis du caractère GPD des génotypes sont évaluées par des approches corrélatives. L'article faisant l'objet de ce chapitre va être très bientôt soumis à la revue « *Journal of Experimental Botany* ».

II Abstract

The strong negative correlation that exists between grain protein concentration (GPC) and grain yield (GY) in bread wheat makes it difficult to improve both these traits simultaneously. However, earlier studies have concluded that the deviation from this relationship (the grain protein deviation or GPD) has a strong genetic basis. Genotypes with positive GPD are characterised by an increased ability to take up nitrogen (N) during the post-flowering period independently of the amount of N taken up before flowering. These observations led to the hypothesis that genetic variability for N satiety could enable the breakage of the negative relationship between GPC and GY. This study is based on two genotypes markedly contrasted for GPD grown under semi-hydroponic conditions differentiated for nitrate availability both before and after flowering. This allows exploration of the genetic determinants of post-flowering N uptake (PANU) by combining whole plant sampling and targeted gene expression approaches. The results highlights the correlation ($r^2=0.81$) with GPC of PANU occurring early during grain development (flowering – flowering + 250 degree-days), independently of GY levels. Early PANU was in turn correlated ($r^2=0.80$) to the stem-biomass increment after flowering through its effect on N sink activity. Differences in early PANU between genotypes, despite comparable N statuses at flowering, suggest that genetic differences in N satiety could be involved in the establishment of the GPC. Through its strong negative correlation with genes implied in N assimilation ($r^2=0.66$ with nitrate transporter TaNRT2.1 expression), root nitrate concentration appears to be a good physiological marker for evaluating instantaneous plant N demand early during grain development, and may provide valuable information on the genotypic N satiety level. This trait may help breeders to identify wheat genotypes having high GPC independently of their yield potentials.

Key words: Grain protein concentration, nitrate uptake, nitrogen satiety, plant nitrogen status, *Triticum aestivum* L.

III Introduction

Grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC) are two major breeding objectives in wheat, as these traits are the dominant determinants of the economic value of the harvested product. GPC influences price, in particular because of its impact on the rheological qualities of the flour (Branlard *et al.*, 2001; Shewry, 2007). It is also a necessary quality criterion for wheat to be eligible for export. However, there is a strong negative relationship between GY and GPC (Simmonds, 1995; Feil, 1997; Monaghan *et al.*, 2001; Triboi *et al.*, 2006; Oury and Godin, 2007) and this presents a major obstacle to the simultaneous improvement of these two traits in breeding programmes. In most developed nations, including in Europe, GY increased greatly during the second half of the 20th century (Calderini and Slafer, 1998; Triboi *et al.*, 2006). This gain was the combined result of improved genotypes obtained through breeding and improved management practices. Unfortunately, the global rise in GY has been associated with a concomitant decrease in GPC (Calderini *et al.*, 1995; Oury *et al.*, 2003). Nevertheless, as stated by Simmonds (1995), breeding programmes focusing on GPC would have been counter-productive because the economic cost of the associated GY penalty would have far exceeded the economic benefit of the protein gain. The classical agronomic strategy for achieving high GY coupled with a good level of GPC is to grow varieties having high GY potential and then to boost their GPC through a protocol in which the final fertiliser application is delayed to just before heading. However, this approach is now being questioned in the context of reduced-input agriculture, due to the excessive economic and ecologic cost of excessive mineral fertiliser usage (Rothstein, 2007).

A new strategy to counteract the negative relationship between GY and GPC, without compromising either of these two traits was proposed by Monaghan *et al.* (2001). This originates in the observation that some genotypes deviate from the linear regression of GPC on GY, either positively or negatively. This deviation, called the Grain Protein Deviation (GPD), has a strong genetic basis (Oury *et al.*, 2003; Oury and Godin, 2007) and may thus provide an alternative selection criterion for simultaneously improving GY and GPC.

Grain N may originate from N taken up either before or after flowering. That taken up before flowering is stored in the vegetative organs but later, during their senescence, is remobilised into the grain. Genotypic differences have been detected for the fraction of grain N originating from remobilisation, both through variation in the amount of N already present in the plant at flowering (Barbottin *et al.*, 2005) and through variation in the N remobilisation efficiency (Kichey *et al.*, 2007; Gaju *et al.*, 2011). Nitrogen taken up by the plant during the post-flowering period can account for between 5 and 40% of total grain N under field conditions (Cox *et al.*, 1986; Palta and Fillery, 1995; Kichey *et al.*, 2007). The relative incorporation in the grain of this later N source is strongly influenced by the soil environment – especially the availabilities of soil N and soil water. Relative incorporation is less influenced by genotype (Cox *et al.*, 1985). Under controlled conditions where environmental constraints are minimised, wheat has the ability to take up N from the soil until near grain maturity (Oscarson *et al.*, 1995a,b; Oscarson, 1996, 2000). However, under field conditions, pre-flowering and post-flowering N uptakes are negatively correlated (Cox *et al.*, 1985; Palta

and Fillery, 1995; Monaghan *et al.*, 2001; Bogard *et al.*, 2010). This negative relationship may be explained by the presence in the soil of a finite amount of available N that can be absorbed either before or after flowering.

It has been shown that post-flowering N uptake (PANU) has a strong impact on GPC (Van Sanford and MacKown, 1987; Gooding and Davies, 1992; Monaghan *et al.*, 2001; Gooding *et al.*, 2007; Kichey *et al.*, 2007). In a growth chamber, under post-flowering conditions where N is non-limiting, PANU may completely meet grain need for N (Taulemesse *et al.*, 2015). Although the physiological basis of the GPD remains unclear, Bogard *et al.*, (2010) demonstrated that it was highly correlated with genotypic capacity to take up N during the post-flowering period independently of the amount of N taken up before flowering. This leads to the hypothesis that genetic variability for GPD could be associated with variations in satiety for N. The positive GPD could thus be associated with genotypes having an increased ability to take up N during the post-flowering period despite a high N uptake before flowering. PANU is hypothesised to be both linked to plant N status at flowering and to the strength of the demand for N exerted by the growing grain (Taulemesse *et al.*, 2015). Such internal regulations of N uptake could represent a potential node of genetic variability that might explain the increased ability of some genotypes to take up N after flowering in a way that was independent of the level of N uptake realised before flowering (Bogard *et al.*, 2010).

Under aerobic soil conditions (classically the case for wheat), N is principally taken up as nitrate (NO_3^-) (Maathuis, 2009). Two main families of root transporters are involved in plants, and these are differentiated by their affinity for NO_3^- . The first is a high-affinity transport system (HATS), coded by NRT2 family genes, and the second is a low-affinity transport system (LATS) coded by NRT1 family genes (Miller *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007; Glass, 2009; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). In *Arabidopsis thaliana*, it has been shown that the involvement of the two transport systems in NO_3^- uptake is dependent on the NO_3^- concentration in the external medium. LATS predominates when the NO_3^- concentration in the medium is high (>1 mM), while HATS predominates when NO_3^- concentration is low (<1 mM) (Tsay *et al.*, 2007). Unlike the model species, information on wheat *NRT* genes is limited. Until recently, only one gene belonging to the NRT1 family had been studied (Wang *et al.*, 2011), although a more recent study identified 16 genes homologous to the *A. thaliana* NRT1 family genes (Buchner and Hawkesford, 2014). Similarly, *TaNRT2.1* is the only gene belonging to the NRT2 family which has so far been characterised in wheat (Yin *et al.*, 2007). This gene is hypothesised to play a central role in wheat post-flowering N uptake (Taulemesse *et al.*, 2015).

Progress in the understanding of the mechanisms underlying N uptake and N assimilation opens the possibility of understanding the genetic variability for complex mechanisms linked to N uptake, such as GPD, at the molecular scale. The objective of this study was to characterise the physiological and molecular markers of GPD, using two genotypes (cvs. Récital and Renan) which contrast markedly with respect of this trait. Employing a semi-hydroponic culture method and closely controlled conditions, the experimental approach allowed fine control of NO_3^- availability and testing for the effects of post-flowering NO_3^- availability on plants having contrasting N statuses at flowering. The study includes

physiological measurements, gene expression quantification, and NO_3^- assays at four developmental stages distributed between flowering and maturity.

IV Material and methods

4.1. Plant material

Two winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes were used in this study, the cvs. Récital and Renan. These were chosen for their strongly contrasting GPD performance found in multi-environment trials (Oury *et al.*, 2003; Bogard *et al.*, 2010) associated with closely comparable grain yields and similar earliness. Both are semi dwarf *Rht-B1b* (Gaju *et al.*, 2011). At comparable levels of GY, Récital has a GPC which is about 1.5% lower than Renan (Oury *et al.*, 2003; Martre, 2003; Le Bail *et al.*, 2005; Bogard *et al.*, 2010). In this genotype pairing, Récital represents the GPD negative partner (GPD-) and Renan the positive one (GPD+).

Calibrated grains (from 45 to 55 mg for Récital and from 60 to 70 mg for Renan) were sown in germination trays filled with compost and placed in a heated greenhouse (20°C) for two weeks. Seedlings were subsequently vernalised for six weeks in a growth chamber (6°C, 8 h photoperiod, light intensity 350 $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$). After vernalisation, they were transplanted to PVC tubes (7 cm diameter, 60 cm high) filled with a perlite:sand substrate (1:1, v:v) for semi-hydroponic culture, with two plants per tube. A total of 256 tubes (512 plants) was set up for each genotype. Tubes were placed vertically in eight containers (four containers per genotype, container area 0.49 m²), at a density of 64 tubes per container. This configuration represents a cover density of 260 plants m², which is comparable to that under field conditions under local agronomic practice.

Plants were then placed in a growth chamber under a long-day photoperiod (16 h light at 20°C, 8 h dark at 18°C, light intensity 650 $\mu\text{mol PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Each tube was fitted with its own automated micro-irrigation system which provided nutrient solution at a rate of 66 ml per 3 h. Nutrient solution composition was adapted from Castle and Randall (1987) (Table S1, Annexe 2). Before flowering, the nutrient solution contained either 4 or 10 mM of NO₃⁻ to create two pre-flowering N treatments which we will refer to as N4 and N10, respectively. During the pre-flowering period, two containers of each genotype were exposed to the N4 pretreatment, and two to N10.

From flowering and for the remainder of the post-flowering period, the nutrient solutions were reassigned among the containers so that one container from the N4 pretreatment and one from N10, were now exposed to low NO₃⁻ availability (4 mM of NO₃⁻). Meanwhile, the other two containers (one from the N4 pretreatment and one from N10) were now exposed to high NO₃⁻ availability (10 mM of NO₃⁻). This created the two post-flowering N treatments, LN and HN, respectively. The factorial design allowed independent observation of the effects of low and high NO₃⁻ availability in both the pre- and post-flowering periods. For each genotype, it created the four treatment combinations: N4-LN, N4-HN, N10-LN and N10-HN.

4.2. Sampling protocol

Four destructive samplings were carried out during the post-flowering period. The first took place one day after flowering (GS65, Tottman *et al.*, 1979), and the other three at GS65+250 degree-day (DD), GS65+450 DD and maturity (GS92). Each sampling was carried out between one and two hours after lighting.

4.3. Physiological measurements

Physiological measurements were carried out on five biological replicates at the four sampling dates, the two pooled plants of each tube being considered as a single replicate. Plants were each divided into six fractions: root, stem, green laminae, senescent laminae, grain and chaff. Only at GS65, spikes were not divided into grain and chaff. After fractioning, areas of green laminae were measured (LI-3100 area meter, LI-COR, Lincoln NE, USA) and spike numbers were counted. The different fractions were then oven-dried at 80°C for 48 h before dry weight (DW) measurements. Samples were subsequently ground using a ball mill, and total N concentrations were measured by the Dumas combustion method using a Flash EA 1112 Series CNS analyser (ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA). GPC was estimated as grain N x 5.7.

Nitrogen Nutrition Index (NNI) was calculated as the above-ground N concentration divided by a critical plant N concentration, defined as the minimum N concentration needed for maximum growth rate (Lemaire and Gastal, 1997). The critical plant N concentration was calculated using the equation described for winter wheat in Justes *et al.* (1994). PANU was calculated as the difference in total plant N between GS92 and GS65, and early PANU as the difference in total plant N between GS65+250 DD and GS65. Remobilisation of N was calculated as the difference between total vegetative N (total plant N, minus grain N) between GS92 and GS65.

4.4. Preparation of root samples for NO₃⁻ concentration and gene expression analysis

Nitrate concentration and gene expression analyses were carried out for the first three sampling dates only, samples collected at maturity exhibited an advanced state of senescence. The same samples were used to assay NO₃⁻ concentration and gene expression. Analyses were carried out on three biological replicates, the two pooled plants from each tube were considered a single replicate. Roots were separated from the aerial parts, washed free of substrate residue with water, and frozen in liquid nitrogen. Root samples were ground while still frozen using a ball mill, and stored at -80°C pending analysis.

4.5. Metabolite measurements

Nitrate concentration measurements were carried out at the Bordeaux INRA Metabolome Platform (https://www.bordeaux.inra.fr/umr619/RMN_index.htm; Bordeaux, France) on sub-

samples of root frozen powder (20 mg), using the spectrophotometric method described in Cross *et al.* (2006).

4.6. qRT-PCR analyses

Total RNA was extracted from sub-samples of frozen root powder (100 mg) using the Nucleomag 96 RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) on the Biosprint 96 (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was subsequently purified with the NucleoSpin 96 RNA kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was carried out on 1 µg of RNA with the iScript Select cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Steps of extraction, purification and reverse transcription were carried out according to the manufacturer's instructions.

The primer pairs used to quantify expression levels of genes coding for two root nitrate transporters *TaNRT1* (GenBank AY587264) and *TaNRT2.1* (GenBank AF332214.1), the nitrate reductase *TaNR* (whose partial sequence comes from Boisson *et al.* (2005)) and the glutamine synthetase 2 *TaGS2* (GenBank DQ124212.1) have been described in Taulemesse *et al.* (2015). The specificities and the efficiencies of the primer pairs had been validated previously.

Quantitative real-time experiments were carried on the Light Cycler 380 (Roche, Indianapolis, IN, USA) with the LightCycler 480 SYBR Green 1 Master Kit. Reactions were made with amounts of 12.5 ng cDNA for *TaNR* and *TaGS2*, or 31.25 ng cDNA for *TaNRT1* and *TaNRT2.1*. PCR reactions were cycled for 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 15 s and 72°C for 15s. A melting curve was analysed at the end of each assay to ensure that single products were amplified. Relative expression was determined using the Δ CT method corrected for primers efficiency (Pfaffl, 2004), and results were normalised to the expression of two housekeeping genes, *Ta54280* and *Ta54948*, selected from Paolacci *et al.* (2009), whose expression stability had already been validated under our experimental conditions.

4.7. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using R v2.15.1 (R Core Team, 2012) after conversion to a per-square-meter basis based on tube surface area. Graphics were drawn using SigmaPlot v8.0.

V Results

5.1. Plant N status at flowering

Two contrasting N treatments were imposed on each of the two cvs. Renan and Récital before flowering (N4 and N10), to obtain plants having distinct N statuses at the flowering stage.

For both Renan and Récital, spike number per square meter, green laminae area, whole plant dry weight, whole plant N concentration, whole plant N and NNI were all strongly impacted by the pre-flowering N treatments ($p < 0.001$) (Table 5-1 p.111). However, the N response of the two genotypes differed for some traits. Both Renan and Récital showed similar spike numbers under N10 condition, and again under N4 conditions. The mean decreases in spike number in response to reduced N were about 24% and 33%, for Renan and Récital respectively. Green laminae area was similar for the two genotypes across the two pre-flowering N treatments ($p = 0.27$), but a significant interaction term between genotype and N treatment ($p = 0.02$) revealed that Récital was more affected by the N4 treatment than Renan. The decrease in green laminae area between N10 and N4 was about 21% for Renan, and 57% for Récital. Whole plant dry weight responded to N deficiency in both genotypes, with an average decrease between N10 and N4 of 31% for Renan and 47% for Récital, but biomass was significantly higher in Renan than Récital across N treatments ($p < 0.001$). The opposite result was observed for whole plant N concentration, with significantly lower levels for Renan than for Récital ($p < 0.001$), despite similar responses to N deficiency with decreases of plant N concentration of 27% for Renan, and 22% for Récital. Total plant N showed no significant difference between the two genotypes. The average decrease in total plant N in response to N deficiency was 50% for Renan, and 59% for Récital. Lastly, NNI levels were similar in the two genotypes under both N4 and N10 conditions (Table 5-1 p.111). Initially, the NNI index was developed to assess plant N status under field conditions (Lemaire and Gastal, 1997), where a value less than '1' indicates N deficiency (Justes *et al.*, 1994). Here, our NNI values were always higher than '1', which suggests this index is not well-suited to the semi-hydroponic conditions of this study. Nevertheless, the results do confirm that the pre-flowering N treatments led to contrasting N statuses at flowering with average NNI values for the N10 and N4 treatments of 1.82 and 1.12, respectively.

Table 5-1 : Spike number, green laminae area, plant dry weight, plant N concentration, total plant N and Nitrogen Nutrition Index (NNI) at flowering for the two genotypes at two contrasting pre-flowering N treatments. Values are the means of ten biological repetitions \pm 1 standard error (SE). Statistical groups are given by post-ANOVA Tukey HSD test for $\alpha=0.05$.

Genotype	N treatment	Spike number (per m ⁻²) \pm SE	Green laminae area (m ² m ⁻²)	Plant dry weight (g m ⁻²) \pm SE	Plant N concentration (%DW) \pm SE	Total plant N (g m ⁻²) \pm SE	NNI \pm SE
Récital	N4	653 \pm 34 <i>c</i>	4.8 \pm 0.4 <i>c</i>	984 \pm 71 <i>c</i>	2.16 \pm 0.10 <i>bc</i>	20.8 \pm 1.2 <i>c</i>	1.10 \pm 0.04 <i>b</i>
	N10	971 \pm 66 <i>a</i>	11.3 \pm 0.6 <i>a</i>	1843 \pm 84 <i>a</i>	2.75 \pm 0.08 <i>a</i>	50.3 \pm 1.4 <i>a</i>	1.82 \pm 0.03 <i>a</i>
Renan	N4	735 \pm 53 <i>bc</i>	8.3 \pm 0.5 <i>b</i>	1480 \pm 87 <i>b</i>	1.87 \pm 0.07 <i>c</i>	27.2 \pm 0.7 <i>b</i>	1.14 \pm 0.02 <i>b</i>
	N10	970 \pm 94 <i>ab</i>	13.0 \pm 1.6 <i>a</i>	2138 \pm 98 <i>a</i>	2.57 \pm 0.16 <i>ab</i>	54.9 \pm 3.4 <i>a</i>	1.83 \pm 0.12 <i>a</i>

5.2. Impact of N treatments on agronomic traits at maturity

At flowering, plants from the N4 and N10 pre-flowering treatments were divided into two identical groups. One group was exposed to a low-N post-flowering treatment (LN), and the other to a high-N treatment (HN). This factorial design allowed us to record the behaviours of initially high- and low-N status plants under high- and low-N conditions during the post-flowering period. At maturity, four key agronomic traits were recorded to characterise the performances of the two genotypes. The traits were: GY, grain N concentration, grain N yield, and N harvest index (Table 5-2 p.112).

The semi-hydroponic growth conditions led to high GY values of between 527 and 1576 g DW m⁻² (Table 5-2 p.112). As expected, GY was positively affected by pre-flowering N treatments in both Récital and Renan ($p<0.001$) but no significant effect of the post-flowering N treatments was detected ($p=0.42$). Combining the results across all treatments, Renan exhibited a higher GY than Récital ($p<0.001$). A significant interaction between genotype and pre-flowering N treatment ($p<0.001$) showed that the GY for Récital was more affected by the low-N pre-flowering treatment (N4) than that for Renan.

Grain N concentrations varied between 2.3% and 3.0% (Table 5-2 p.112), these corresponding to high levels of GPC (13.2% and 17.3% respectively). Interestingly, the Anova revealed no significant effect of post-flowering N treatment on grain N concentration, as previously observed for grain yield. However, there was a strong genotype effect ($p<0.001$) and a significant interaction between genotype and pre-flowering N treatment ($p<0.001$). Hence, Renan had a higher grain-N concentration than Récital, which resulted principally from strong differences observed between the two genotypes when submitted to N10 pre-flowering treatment. An interesting observation was the opposite-going response of the two genotypes to the pre-flowering N treatments, revealed in the significant interaction term.

Here, an increase in pre-flowering N availability led to a decrease in grain N concentration in Récital, but to an increase in Renan.

Table 5-2 : Grain yield, grain N concentration, total grain N and N harvest index at maturity for the two genotypes studied under four N treatments. Values are the means of five biological repetitions \pm 1 standard error (SE). Statistical groups are given by post-ANOVA Tukey HSD test for $\alpha=0.05$.

Genotype	N treatment	Grain yield (g m ⁻²) \pm SE	Grain N concentration (%DW) \pm SE	Total grain N (g m ⁻²) \pm SE	N Harvest Index \pm SE
Récital	N 4-4	527.4 \pm 62.3 <i>d</i>	2.62 \pm 0.19 <i>ab</i>	13.47 \pm 1.33 <i>e</i>	0.41 \pm 0.02 <i>b</i>
	N4-10	778.6 \pm 133.7 <i>cd</i>	2.65 \pm 0.11 <i>ab</i>	20.06 \pm 2.74 <i>de</i>	0.46 \pm 0.04 <i>b</i>
	N10-4	1531.6 \pm 116.5 <i>a</i>	2.31 \pm 0.06 <i>b</i>	35.14 \pm 1.95 <i>abc</i>	0.49 \pm 0.04 <i>b</i>
	N10-10	1384.0 \pm 153.4 <i>ab</i>	2.33 \pm 0.04 <i>b</i>	32.25 \pm 3.72 <i>c</i>	0.43 \pm 0.03 <i>b</i>
Renan	N 4-4	1281.4 \pm 80.9 <i>ab</i>	2.68 \pm 0.03 <i>ab</i>	34.29 \pm 2.01 <i>bc</i>	0.66 \pm 0.05 <i>a</i>
	N4-10	1016.6 \pm 77.4 <i>bc</i>	2.64 \pm 0.11 <i>ab</i>	26.51 \pm 1.35 <i>cd</i>	0.50 \pm 0.05 <i>b</i>
	N10-4	1576.3 \pm 72.5 <i>a</i>	2.81 \pm 0.08 <i>a</i>	44.28 \pm 2.52 <i>ab</i>	0.62 \pm 0.03 <i>a</i>
	N10-10	1502.8 \pm 81.4 <i>a</i>	3.04 \pm 0.10 <i>a</i>	45.41 \pm 1.62 <i>a</i>	0.48 \pm 0.03 <i>b</i>

Total grain N was influenced mostly by GY as the latter trait varied more in response to N availability. Analysis of total grain N showed a significant genotype effect ($p<0.001$) and pre-flowering N treatment effect ($p<0.001$). The two genotypes both responded positively to high pre-flowering N availability, although when all treatments were combined, Renan had a higher grain N yield, than Récital.

The N harvest index (NHI) provides information on the distribution of N between the vegetative organs and the grain. Interestingly NHI was significantly influenced by genotype ($p<0.001$), by post-flowering N treatment ($p<0.001$) and by the interaction between genotype and post-flowering N treatment ($p<0.001$). Renan had a higher NHI than Récital, due to the high NHI levels recorded in the low-N post-flowering treatment (LN). The significant interaction term between genotype and post-flowering N treatment reveals that the increase in NHI observed for the post-flowering LN treatment in Renan was not apparent in Récital.

5.3. Relations between grain yield and grain N concentration

The relationship between grain yield and grain N concentration is at the basis of the calculation of GPD. This study does not allow GPD to be calculated *stricto sensu* because it considers only two genotypes. Nevertheless the graphical representation of the relationship between GY and grain N concentration at maturity (Figure 5-1 C p.113) does offer a good visualisation of both genotypes and N treatment effects. In particular, the causes for Renan's higher total grain N appears clearly. While this was caused by a higher GY than Récital in the

case of the low-N pre-flowering treatment (N4), this trait was caused by a higher grain N concentration in the high-N pre-flowering treatment (N10).

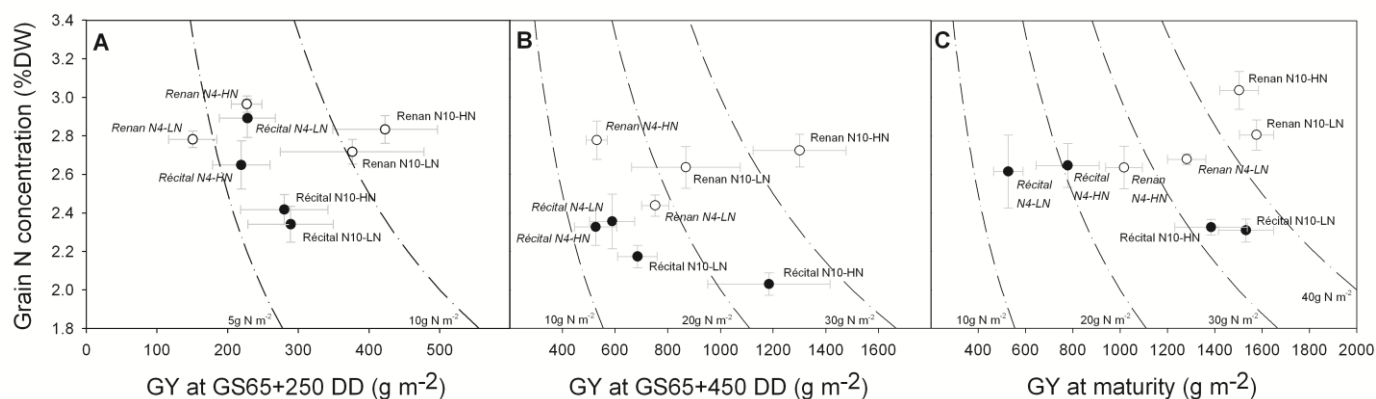


Figure 5-1 : Relations between grain yield and grain N concentration at three post-flowering developmental stages. Data were collected at GS65+250 DD (A), GS65+250 DD (B) and at maturity (C) for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Dotted lines are iso-grain N yield. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error.

The relation between GY and grain N concentration was also observed at two intermediate stages of grain development. At GS65+250 DD (Figure 5-1 A p.113) and at GS65+450 DD (Figure 5-1 B p.113), there was no significant genotype effect on GY, whereas grain N concentration was already significantly higher in Renan across all treatments ($p < 0.001$). These results show that differences between the two genotypes in grain N concentration observed under N10 are likely to have been established early in grain development. Oppositely, the differences in grain yield observed under N4 occurred at a later stage. Pre-flowering N treatment effects on grain N concentration and GY were also already effective ($p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively), revealing that for Récital, the N4 pre-flowering treatment led to higher grain N concentration than N10 early during grain filling.

5.4. Post-flowering N uptake and N remobilisation

Post-flowering N uptake (PANU) ranged between 11 and 36 g m⁻² (Figure 5-2A p.114), representing from 30 to 100 % of total grain N at maturity. In the case of the HN post-flowering treatment, PANU represents the equivalent of 71 to 100% of total grain N. The Anova reveals a significant genotypic effect, with higher PANU levels in Renan ($p = 0.04$), and a strong post-flowering N treatment effect ($p < 0.001$) showing that the HN treatment led to overall increases in PANU. However, a third-order interaction, genotype \times post-flowering N treatment \times pre-flowering N treatment ($p = 0.003$) emphasises that this trait is responsive to

complex interaction effects, so the main factor effects should be interpreted cautiously. The main point to highlight for PANU is the marked difference observed between LN (12 g m⁻²) and HN (36 g m⁻²) post-flowering treatments in Renan plants subjected to the N10 pre-flowering treatment. This was clearly highly influenced by N availability during the post-flowering period.

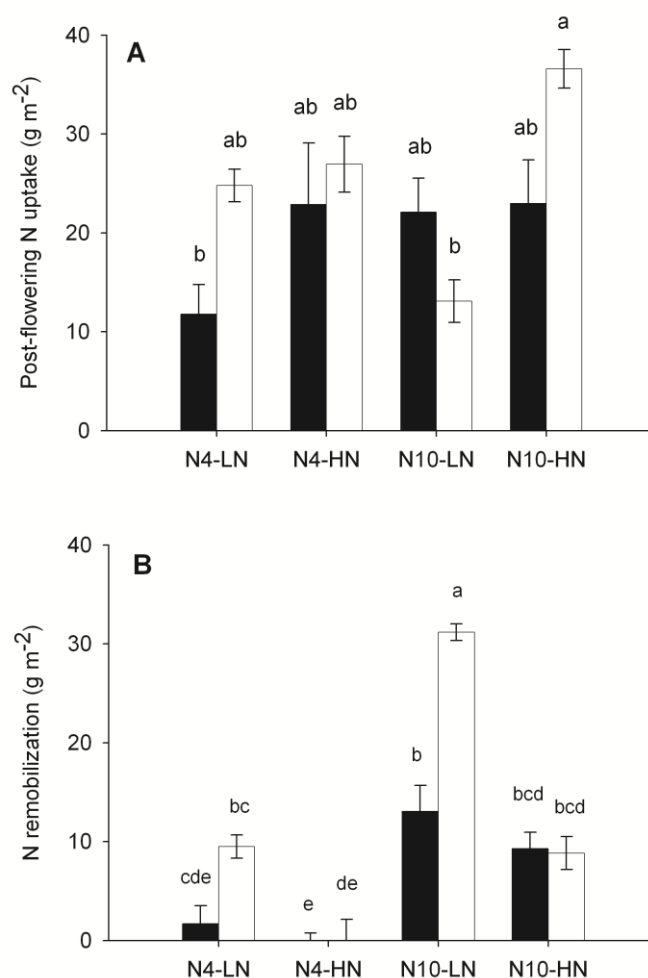


Figure 5-2 : Post-flowering N uptake (A) and N remobilisation (B) for Réctal (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 and N10 combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error. Statistical groups are given by post-ANOVA Tukey HSD test for $\alpha=0.05$.

In this study, it was found that PANU was not significantly correlated with N remobilisation ($p=0.458$), which contrasts with significant and negative correlations reported

from experiments carried out under field conditions that focused on genotypic effects (Cox *et al.*, 1986; Monaghan *et al.*, 2001; Bogard *et al.*, 2010). Remobilisation of N from vegetative parts to the grain varied between 0 and 31 g m⁻² (Figure 5-2B p.114), representing from 0 to 70% of total grain N. In the case of HN post-flowering treatment, remobilisation always represented less than 29% of total grain N. Anova revealed that N remobilisation is a complex trait, impacted by all three main factors (genotype, $p < 0.001$; pre-flowering N treatment, $p < 0.001$; post-flowering N treatment, $p < 0.001$) and interaction terms between genotype and post-flowering N treatment ($p < 0.001$), together with a third-order interaction ($p = 0.038$). Overall, Renan remobilised more than Récital, which is mostly explained by the high values observed for Renan plants exposed to N10-LN and N4-LN treatments. Remobilisation was also generally favoured in the N10 pre-flowering treatment and LN post-flowering treatment, leading to high N stocks in vegetative parts at flowering and low N availability during the post-flowering period, respectively. Lastly, the interaction between genotype and post-flowering N treatment effects reflects the higher capacity of Renan to increase its remobilisation when exposed to the LN post-flowering N treatment.

5.5. Relation between grain N concentration and early PANU

In this study, early PANU occurring from GS65 to GS65+250 DD represents a highly variable part of total PANU, ranging between 2% and 74% depending on genotype and N treatment. This early PANU was positively correlated with grain N concentration at maturity ($p = 0.002$) (Figure 5-3 p.116), as well as with grain N concentration measured at GS65+250 DD ($p = 0.040$), and at GS65+450 DD ($p = 0.002$) (Figure S1, Annexe 2). Among all measured traits in this study, early PANU was the only one which displayed a significant correlation with grain N concentration at maturity. The total PANU measured at maturity was not significantly correlated with grain N concentration ($p = 0.414$).

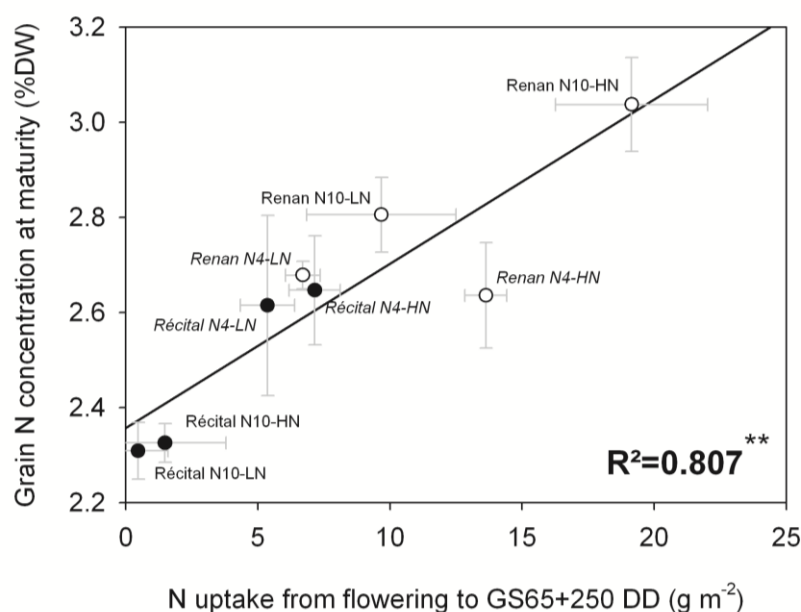


Figure 5-3 : Relation between N uptake from flowering to GS65+250 DD and grain N concentration at maturity for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error.

5.6. Physiological and molecular determination of early PANU

At a physiological level, early PANU at GS65+250 DD was positively correlated with the stem biomass increment between GS65 and GS65+250 DD ($r^2=0.80$; $p=0.003$) (Figure 5-4 p.117); the stem biomass increment from GS65 to GS65+250 DD being itself under the influence of a genotypic effect ($p<0.001$) with higher levels observed for Renan.

At a molecular scale, although not statistically significant, PANU at GS65+250 DD was positively correlated with either the expression of the NO_3^- high-affinity transporter *TaNRT2.1* ($p=0.145$) (Figure 5-5A p.118) and that of the low-affinity transporter *TaNRT1* ($p=0.055$) (Figure 5-5B p.118). At GS65+250 DD, *TaNRT2.1* expression levels were significantly correlated with those of *TaNR* (Figure 5-6A p.119) and *TaGS2* (Figure 5-6C p.119). At the same developmental stage, *TaNRT1* expression levels correlated positively with those of *TaNR* (Figure 5-6B p.119), but were not correlated with those of *TaGS2* (Figure 5-6D p.119). Genes coding for root NO_3^- transporters as well as genes coding for NR and GS2 exhibited higher expression levels in Renan than in Récital at GS65+250DD ($p=0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, and $p=0.02$, respectively for *TaNRT2.1*, *TaNRT1*, *TaNR*, and *TaGS2*).

Finally, *TaNRT2.1* expression and root NO_3^- concentrations were negatively correlated at GS65+250 DD ($p=0.015$) (Figure 5-6E p.119), whereas no correlation was observed between *TaNRT1* expression and root NO_3^- concentration ($p=0.202$) (Figure 5-6F p.119). Root NO_3^-

concentrations were significantly higher in Récital than in Renan ($p < 0.001$). An effect of pre-flowering NO_3^- treatment was also revealed by the Anova test, showing that the N10 treatment led to higher root NO_3^- concentrations than the N4 treatment ($p = 0.001$).

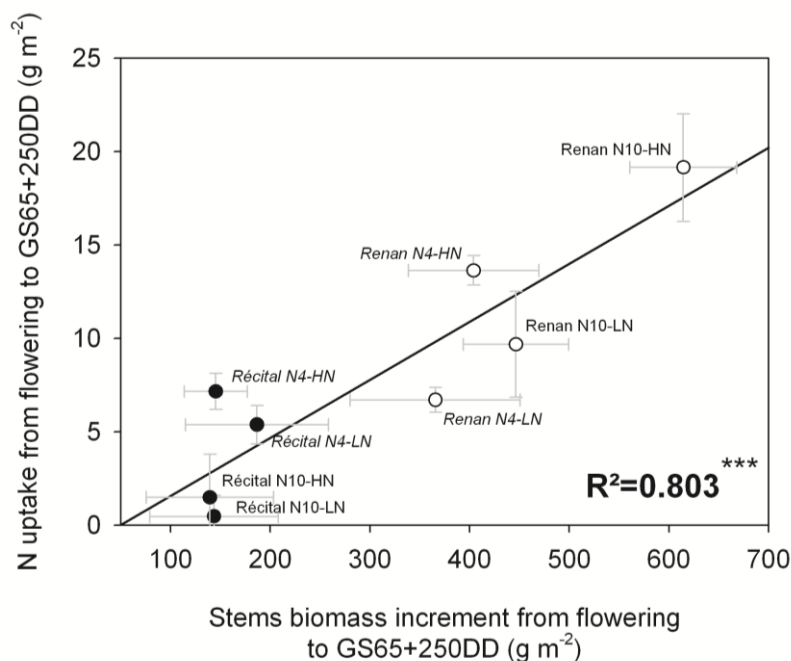


Figure 5-4 : Relation between stem biomass increment and N uptake from flowering to GS65+250 DD for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error.

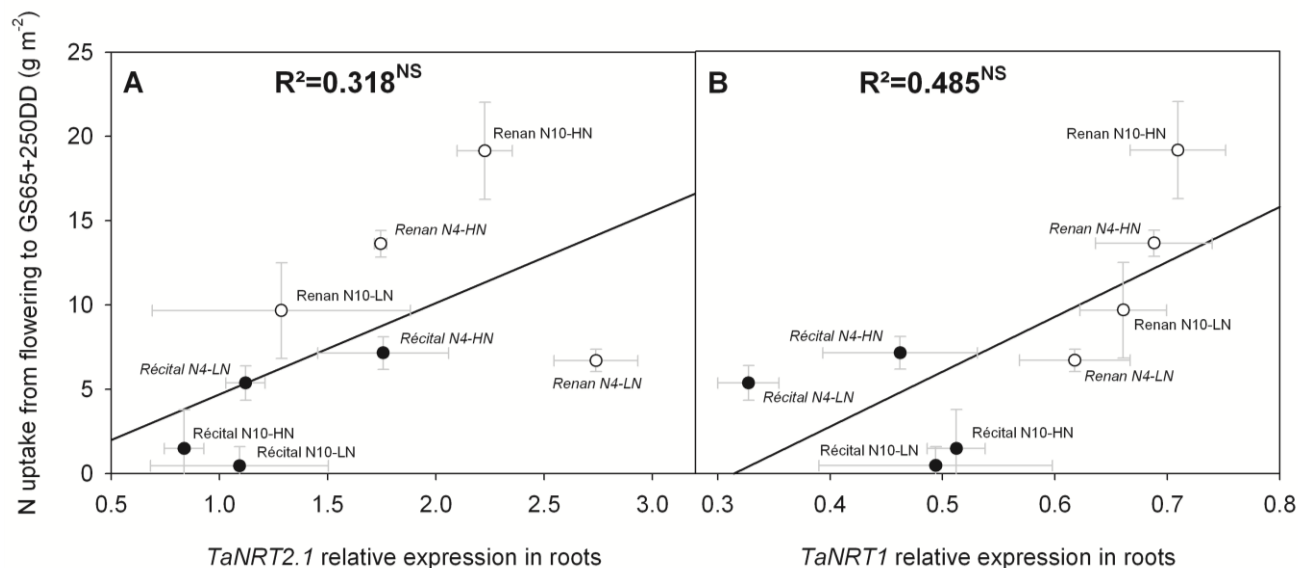


Figure 5-5 : Relations between expression levels of genes coding for root nitrate transporters and N uptake from flowering to GS65+250 DD. Relations are for *TaNRT2.1* relative expression in roots at GS65+250 DD (A) and *TaNRT1* relative expression in roots at GS65+250 DD (B). Values are for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error.

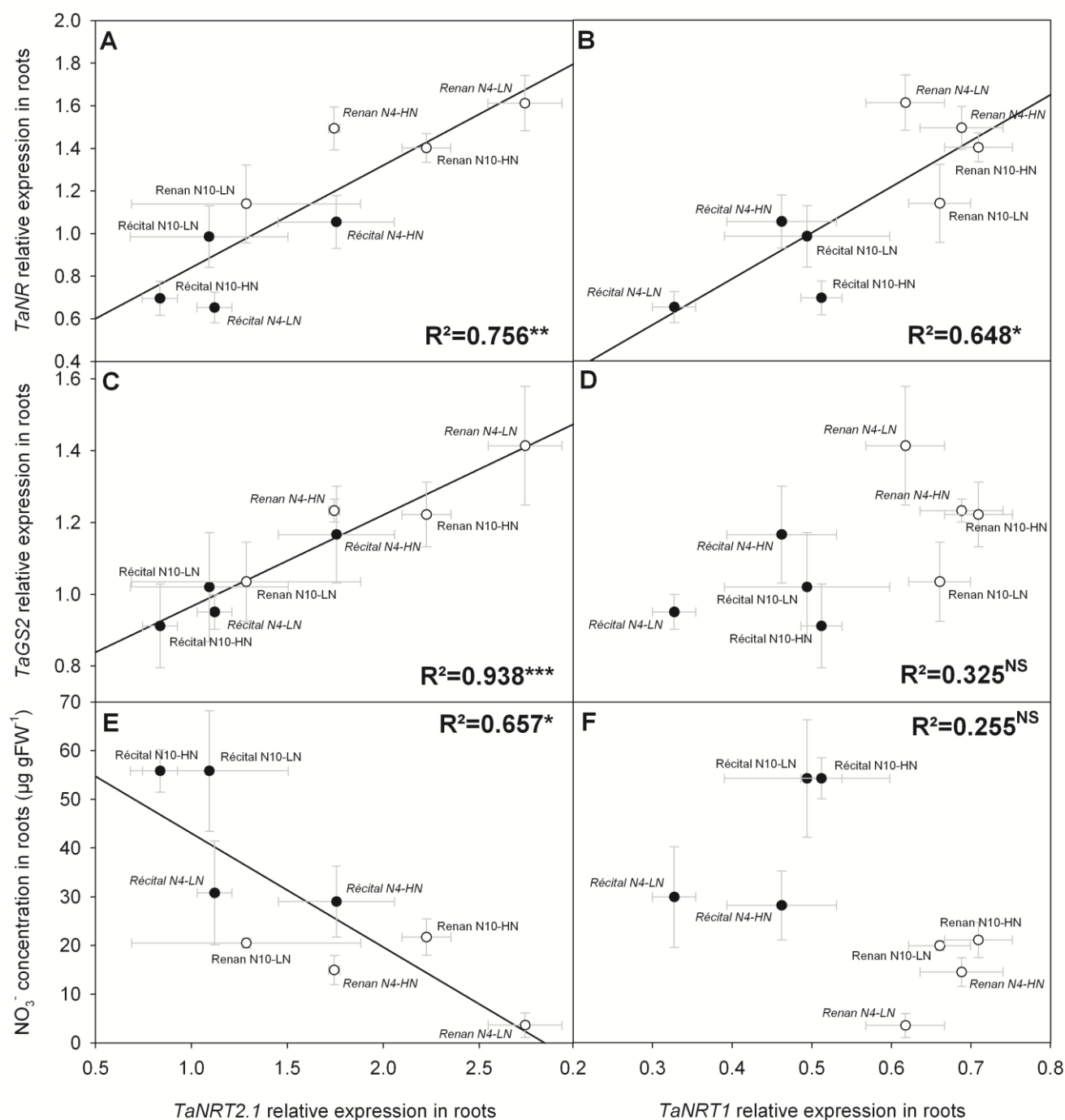


Figure 5-6 : Relations between relative expression levels of genes coding for root nitrate transporters and relative expression levels of genes involved in nitrate assimilation, or nitrate concentration in roots at GS65+250 DD. Relations are for *TaNRT2.1* and *TaNr* (A), *TaNRT2.1* and *TaGS2* (C), *TaNRT2.1* and root NO_3^- concentration (E), *TaNRT1* and *TaNr* (B), *TaNRT1* and *TaGS2* (D), *TaNRT1* and root NO_3^- concentration (F). Values are for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates ± 1 standard error.

VI Discussion

6.1. Growing conditions and choice of genotypes

The literature reveals that most studies of wheat root processes at a fine scale used plants grown under hydroponic conditions. Most of these studies have targeted seedlings or young plants (see for example Ren *et al.*, 2012). The achievement of a whole crop cycle under hydroponic conditions is challenging, as it requires a good control of environmental parameters and also of the elemental balance of the nutrient solutions. Nevertheless, the semi-hydroponic approach allows an excellent level of fine control of N availability and it also allows extremely rapid changes to be made to the effective N availability because of the low N-retention capacity of the substrate. Compared to field trials, these features are particularly useful in allowing independent control of the available N before and after flowering, without neglecting any genetic differences in terms of plant phenology.

In this study, we used an approach based on two contrasting NO_3^- concentrations (4 and 10 mM) before flowering. The 10 mM NO_3^- concentration is generally considered non-limiting for hydroponic wheat (Carillo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Taulemesse *et al.*, 2015), while 4 mM NO_3^- generates a significant N stress but without having drastic effects on canopy structure in terms of tiller density and dynamics (Taulemesse *et al.*, 2015). Clearly, our objective of generating contrasting N statuses at flowering was met as shown by the significant differences between N4 and N10 for all the physiological traits measured at flowering (spike number, green laminae area, plant dry weight, plant N concentration, total plant N and NNI) (Table 5-1 p.111). After flowering, plants from each pre-flowering treatment were subjected to either a high-N (10 mM; HN) or a low-N (4 mM; LN) post-flowering N treatment in order to observe the independent effects of N availability before and after flowering. Although N status at flowering had large effects on GY, post-flowering N availability effects were lower than expected on GPC. This shows that even if the N4 treatment was clearly limiting for N during the pre-flowering period, the LN post-flowering treatment was not highly N deficient. However, these contrasting treatments allow significant differences in total grain N at maturity to be created, a circumstance particularly favourable for research into GPD determinism. For this, our strategy was to use two significantly contrasting genotypes for GPD based on an earlier robust characterisation of this trait in field studies (Oury *et al.*, 2003; Bogard *et al.*, 2010). However, the experimental design used in this study cannot precisely confirm that genotypic characteristics are fully comparable to those expressed in field experiments because of the comparative nature of the GPD calculations based on a regression using large numbers of cultivars. However, genotypic ranking for GPD can be reasonably estimated by a ranking for protein yield (Koekemoer *et al.*, 1999; Oury and Godin, 2007). Under our conditions and following this assumption, Renan clearly exhibited larger grain N values than Récital, showing that the genetic component implied in protein yield was expressed under our controlled conditions in a way similar to in the field (Groos *et al.*, 2003; Le Bail *et al.*, 2005; Bogard *et al.*, 2010). These results suggest that GPD may be a

sufficiently robust genetic character to be expressed even under such different growing conditions.

6.2. GPC at maturity is correlated with early PANU at GS65+250 DD

Under field conditions, numerous studies have highlighted that PANU has a larger effect on grain N than on yield (Van Sanford and MacKown, 1987; Gooding and Davies, 1992; Monaghan *et al.*, 2001; Gooding *et al.*, 2007; Kichey *et al.*, 2007). In the present study we found no correlation between total PANU and GPC ($r^2=0.11$; $p=0.414$). This lack of correlation may be a result of the highly variable balance between PANU and N remobilisation depending on genotype, N status at flowering, and N availability during the post-flowering period recorded under our particular growing conditions.

However, a strong correlation was found between GPC and early PANU (e.g. PANU calculated only between flowering and GS65 + 250 DD). This result, although only correlative, suggests this trait is a strong driver of final GPC. Quantitatively, PANU occurring early during grain development defined as above, represented on average 36% of total PANU. Oscarson *et al.* (1995a), in a study based on four spring wheat genotypes grown hydroponically, observed an even higher value, with about 50% of total PANU occurring before the end of grain cell division. Similarly, this proportion of early PANU may be high under field conditions, because of the various environmental limits to PANU occurring later during grain filling - water stress in particular. Taken together, these results suggest a strong effect of early PANU on GPC, accounting both for existing genetic variability and environmental conditions. Datasets that allow us to temporally dissect the relationship established over the entire post-flowering period are scarce. Under non-limiting conditions for N, in hydroponic culture, Taulemesse *et al.* (2015) highlighted that PANU exhibits a marked dynamic during the post-flowering period. The analysis of this pattern led to the division of the post-flowering period into three distinct phases, differentiated by the level of N uptake. In these three phases, the first and the third (occurring from GS65 to GS65+300DD and from GS65+400DD to maturity, respectively) presented significant levels of N uptake. Further, these authors showed that PANU occurring during the first phase (grain cell division) was strongly impacted by plant N status at flowering, whereas the third phase corresponding to the active phase of grain N filling was controlled mainly by N demand exerted by grain growth. Clearly, our results suggest that the N taken up after flowering has a differential effect on GPC depending of the timing at which it occurs during the post-flowering period. Supporting this idea, in a study based on a high GPC genotype grown hydroponically, Oscarson *et al.* (1995b) have shown that the timing of short extra applications of N during the post-flowering period impacts GPC for N-limited plants, the higher GPC being obtained with the late extra applications of N. However, it is difficult to know whether the results of Oscarson *et al.* (1995b) can be transposed to non-deficient plants where GY is not impacted by N starvation during the post-flowering period as in our study. With a different approach based on a multi-local study under field conditions on mapping populations, Bogard *et al.* (2010) reported that GPD measured at GS65+250 DD is well correlated with GPD measured at maturity ($r^2=0.50$), possibly indicating an early determinism of this trait. As GPD was strongly correlated with

genotype capacity to take up N after flowering independently of the level of N uptake before flowering, these authors hypothesised that early PANU could play a strong role in GPD. This hypothesis is in accordance with our results which show that a high early PANU is associated with a high GPC under our controlled conditions, independently of GY level.

6.3. Genetic variability for early PANU regulation

Quantitatively, early PANU represents a highly variable component of total grain N at maturity, ranging from 1% to 51% depending on genotype and N treatment. On average, early PANU was higher for Renan than for Récital (12.28 g m⁻² and 3.6 g m⁻², respectively). In addition to these quantitative variations, the two genotypes displayed contrasting controls of early PANU (Figure S2, Annexe 2). On the one hand, in Récital, the ratio of early PANU over total grain N at maturity was influenced mainly by plant N status at flowering (*i.e.* showing a strong effect of pre-flowering N treatment) with values of about 41% for plants exposed to the N4 pre-flowering treatment, and less than 7% for plants exposed to the N10 one, with no effect of the post-flowering N treatment. Comparable results have already been described for Récital, with higher early PANU observed for plants having low N status at flowering (Taulemesse *et al.*, 2015). On the other hand, in Renan, this ratio was impacted mainly by post-flowering N availability, with values around 20% for plants exposed to the LN post-flowering treatment, compared with about 45% for plants exposed to the HN one, while the effect of pre-flowering N treatment was negligible. This argues strongly for genotypic differences in the control of early PANU.

The regulation of N uptake is under the control of complex mechanisms. Earlier studies have shown that N uptake is driven not only by soil N availability but also by plant N demand (Imsande and Touraine, 1994; Feil, 1997; Olesen *et al.*, 2002; Sadras and Rodriguez, 2010). Under hydroponic conditions, plant N uptake occurs until late in plant development (Mattsson *et al.*, 1992; Oscarson *et al.*, 1995a,b; Oscarson, 1996, 2000, Taulemesse *et al.*, 2015), and roots have the ability to take up N even when the concentration in the medium is extremely low (Oscarson *et al.*, 1995a). Under such conditions, plant N demand could play a central role in N uptake variability. Accordingly, the early PANU observed in Récital was not significantly affected by post-flowering N availability, while the effect of plant N status at flowering was dominant. However, the observations in Renan suggest plant N status at flowering may have less impact on early PANU for this genotype, which was more limited by N availability. Despite the fact that Renan and Récital had roughly comparable NNI at flowering, their N uptakes differed during the days following flowering, particularly for plants exposed to the N10 pre-flowering treatment. This suggests that although NNI is a valuable integrative indicator of limitation of carbon acquisition by plant N concentration during vegetative growth (Justes *et al.*, 1994), this index does not seem to be so relevant to the assessment of post-flowering N uptake, as genetic variability exists at particular NNI values. These findings argue for the existence of a genetic difference in N satiety at similar NNI. In this case, N satiety could be defined as the maximum level of plant N accumulation, corresponding to a state of plant N saturation. Genotypic variability for N satiety may thus be related to genotypic deviations from the “maximum N dilution curve” described by Justes *et*

al., (1994). Hence, N satiety may influence the genotypic capacity to take up luxury levels of N, i.e. amounts not strictly necessary for growth but possibly beneficial to GPC. Genetic differences for N satiety have previously been hypothesised to be involved in the determination of GPD (Bogard *et al.*, 2010), and could partly explain the reasons for the higher sensibility to N starvation of Récital observed previously (Le Gouis *et al.*, 2000).

6.4. Genetic variability for early PANU is linked to vegetative growth after flowering

As noted above, internal regulatory mechanisms of N uptake are driven mainly by physiological parameters such as organ growth and the N concentration of already-formed organs. Early PANU occurs during a period when growing organs represent only a moderate biomass accumulation, because grains have not yet reached a rapid growth phase and the photosynthetic apparatus is already fully developed. The grain biomass increment from GS65 to GS65+250 DD does not appear to explain early PANU, as these two traits were not significantly correlated in the present study ($p=0.261$). This finding is in accordance with previous results obtained by Taulemesse *et al.* (2015) in Récital which rather suggest a major role for plant N status in N uptake at this developmental stage. In the framework of model development for grain protein concentration in wheat, Martre *et al.* (2006) suggested that the rate of N uptake after flowering could be limited by the N storage capacity of the stem. The latter relies on biomass increment and/or N accumulation in existing tissues. In this sense, some studies have shown that stem biomass may continue to increase during about one week after flowering, especially through peduncle elongation (Waldren and Flowerday, 1979; Bertheloot *et al.*, 2012). Potentially, the growth of this structural organ could create a sink demand for N, thus influencing N uptake, especially as stem biomass increments from GS65 to GS65+250 DD exceeded grain biomass accumulation for some genotype x N treatment combinations in the present study. As a result, early PANU displayed a positive correlation with the stem biomass increment from GS65 to GS65+250DD (Figure 5-4 p.117) but not with stem N concentration variation during the same phase ($p=0.946$). Bertheloot *et al.* (2008, 2012) highlighted that significant genetic variability exists for post-flowering stem growth, based on a comparison of two genotypes in each experiment. Thus, this trait may be an interesting candidate for explaining part of the genetic variability observed for early PANU. Clearly, the correlative approach used in the present study does not provide any causal demonstration of the link between the two traits. However, the high levels of NNI measured at flowering do seem to indicate that plant growth during the early post-flowering phase was not limited by plant N under our conditions, with values always higher than 1. This suggests that observed genetic differences for stem growth after flowering were probably not a consequence of N uptake, but were more likely partly causal. Regulation of stem growth after flowering could thus be involved in grain N concentration determination.

6.5. Molecular determination of early PANU

Genes implicated in plant N uptake and N assimilation network have been described largely in model species such as *A. thaliana* (Miller *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007; Glass,

2009; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Not all homologs of these genes have yet however been characterised in wheat, leading to an incomplete characterisation of N uptake through gene expression studies. Nevertheless, expression quantification of some key genes involved at different levels of N metabolism allows the establishment of a good overview of the N assimilation process. In this study, we observed no significant correlation between early PANU and root N transporter expression, either for *TaNRT2.1* or *TaNRT1*. This result differs from that of a previous study (Taulemesse *et al.*, 2015) showing a significant correlation between PANU and *TaNRT2.1* expression level. Similarly, in maize, Garnett *et al.* (2013) showed that *ZmNRT2.1* and *ZmNRT2.2* expression patterns correlated well with the N uptake pattern. The methodology used in the present study to calculate early PANU may explain this lack of significant correlation. Indeed PANU was calculated based on total plant N differences between two sampling dates (and therefore integrating plant functioning over the whole period) while expression results were based on instantaneous measurements. We believe this may have reduced the accuracy of the relationship which nevertheless shows a positive trend (Figure 5-5A p.118).

In addition, the relation between *TaNRT2.1* expression at GS65+250 DD and early PANU was significantly positive ($p=0.007$) after exclusion of Renan N4-LN. This treatment x Genotype combination exhibited the highest *TaNRT2.1* expression level but a very low N uptake. In this case, a consequent N demand that cannot be fulfilled under LN conditions can be hypothesised. The positive correlation between early PANU and *TaNRT2.1* expression levels at GS65+250 DD without Renan N4-LN suggests that *TaNRT2.1* could have played an important role in early PANU, although its expression levels did not explain N uptake when N demand was not satisfied.

This assumption is strengthened by the observation that *TaNRT2.1* expression was in turn significantly correlated with *TaNR* and *TaGS2* expression levels at GS65+250 DD, suggesting a consistency between N uptake, N reduction and N assimilation genes (Figure 5-6 p.119). A synchronous regulation of genes coding for N transport, reduction and assimilation against NO_3^- environment has been substantially described in a range of species such as *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2000), *Oriza sativa* (Cao *et al.*, 2008), and *Zea mays* (Gowri *et al.*, 1992; Redinbaugh and Campbell, 1993; Stitt, 1999; Forde, 2000). However, the regulation of N uptake and N assimilation systems at the molecular level has not clearly been established. At least two putative regulatory signals have been proposed for N uptake regulation. The first is circulating amino-acids such as glutamine (Vidmar *et al.*, 2000; Nazoa *et al.*, 2003; Barneix, 2007) and the second is NO_3^- itself (Siddiqi *et al.*, 1990; King *et al.*, 1993; Wang, 2004). In Taulemesse *et al.* (2015) and in the present study, *TaNRT2.1* expression levels at GS65+250 DD were negatively correlated with NO_3^- concentration in roots, suggesting that NO_3^- concentration could be an internal marker of plant N demand with a putative direct or indirect regulatory role on genes coding for N metabolism. Similarly, *TaNR* and *TaGS2* expression levels were negatively correlated with root NO_3^- concentration (Figure S3, Annexe 2). The hypothesis identifying NO_3^- concentration in roots as a marker of plant N demand is also supported by physiological measurements, as NO_3^- levels in roots were significantly lower in N4 than in N10 at flowering independently of genotype. The rapid increase in NO_3^- level in roots after the switch from N4 to HN tends to corroborate this assumption. The putative role

of NO_3^- concentration in roots as a marker of plant N demand is also implied by genotypic differences. Indeed, the higher levels of early PANU observed in Renan were accompanied by lower root NO_3^- concentrations in this genotype than in Récital, regardless of the pre-flowering N treatment (Figure S4, Annexe 2).

Excluding Renan N4-LN, the relation between NO_3^- concentration and early PANU became significant ($p=0.018$; Figure S5, Annexe 2). The outlier nature of Renan N4-LN is probably a result of the same factors previously suggested for the relation between *TaNRT2.1* expression level and early PANU. Genetic effects on early PANU could thus be based on differences in NO_3^- concentration in roots, despite comparable NNI, revealing different N satiety levels.

6.6. Putative influence of satiety level on the balance between PANU and N remobilisation

In the present study, PANU and N remobilisation were not significantly correlated ($p=0.458$) when considering the two genotypes and the four N conditions. The absence of correlation was probably influenced by the contrasting N environments used in both the pre-flowering and the post-flowering periods, but was also a result of a genotypic effect. Renan showed both higher PANU and N remobilisation than Récital with all treatments combined (Figure 5-2 p.114), showing that Récital did not compensate for its lower N uptake by N remobilisation. The N remobilisation under LN treatment in Renan was generally higher, leading to a higher NHI of this genotype than Récital when exposed to low N availability during the post-flowering period (Table 5-2 p.112). Under field conditions, the low capacity of Récital to achieve high remobilisation levels has already been observed (Kichey *et al.*, 2007). These results seem to indicate that Renan has both a higher capacity to take up N when N is available and a lower threshold for N remobilisation than Récital. Based on the fact that remobilisation is involved when N uptake cannot meet N demand, it is plausible that the specific satiety level of each genotype influences the triggering of this phenomenon. According to this, despite comparable NNI levels, a variety having a high luxury N demand must have more difficulty taking up enough N to be satiated than a variety having a low luxury N demand, which may precipitate the onset of senescence. Thus, as root NO_3^- concentration seems to be a reliable indicator of plant N demand, cultivars presenting low NO_3^- concentrations in their roots even at high NNI, could be both more effective in N uptake when N is available, and better able to use N stored in vegetative parts when the availability of N is insufficient during grain filling.

VII Conclusion

This study aimed to identify genetic differences in the establishment of GPC in order to better understand the genetic bases of GPD. Based on the behavior of two genotypes having strongly contrasting GPC grown under controlled conditions with varying NO_3^- availabilities, we show that GPC is positively correlated with early PANU from GS65 to GS65+250 DD independently of GY level. At a physiological level, the study suggests that early PANU could be impacted by stem biomass increment during early growth stages following flowering, although the regulatory mechanisms of this are unknown. At a molecular scale, the negative correlation between root NO_3^- concentration and N network genes expression levels suggests that root NO_3^- concentration is a good candidate for evaluating instantaneous plant N demand, and may provide valuable information on genotype satiety level when measured at high NNI. Although these findings have still to be validated with a larger number of genotypes, this study attempts to open new research routes to develop a better understanding of the physiological and molecular bases of genetic determination of grain N concentration involved in GPD. On the basis of our results, genotypes having a low NO_3^- concentration in the roots, even at high NNI levels, may be interesting subjects for breeding as they have a tendency to accumulate more N both at flowering and during the early post-flowering growth stages, but they also seem more able to remobilise N, when it's availability is reduced during grain filling.

VIII Acknowledgements

The authors thank Joelle Messaoud, Antoine Bordes and Julien Mazuel (INRA Clermont-Ferrand) for their help with experiments. The authors are also grateful to Patricia Ballias and Duyen Prodhomme (INRA Villenave d'Ornon) for their help in nitrate assays. Sandy Lang (rescript.co.nz) proofread and provided language assistance. This work was supported by the French "Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale" (FSOV) 2010F project (2011-2013). The authors are also grateful to the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) which supports the PhD thesis (CIFRE 878/2011) during which the analyses were conducted.

References

- Le Bail M, Jeuffroy M-H, Bouchard C, Barbottin A.** 2005. Is it possible to forecast the grain quality and yield of different varieties of winter wheat from Minolta SPAD meter measurements? *European Journal of Agronomy* **23**, 379–391.
- Barbottin A, Lecomte C, Bouchard C, Jeuffroy M-H.** 2005. Nitrogen Remobilization during Grain Filling in Wheat. *Crop Science* **45**, 1141.
- Barneix AJ.** 2007. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* **164**, 581–590.
- Bertheloot J, Andrieu B, Martre P.** 2012. Light–nitrogen relationships within reproductive wheat canopy are modulated by plant modular organization. *European Journal of Agronomy* **42**, 11–21.
- Bertheloot J, Martre P, Andrieu B.** 2008. Dynamics of light and nitrogen distribution during grain filling within wheat canopy. *Plant physiology* **148**, 1707–1720.
- Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J-M, Jeuffroy M-H, Gate P, Martre P, Le Gouis J.** 2010. Deviation from the grain protein concentration–grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4303–4312.
- Boisson M, Mondon K, Torney V, et al.** 2005. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **110**, 932–940.
- Branlard G, Dardevet M, Saccomano R, Lagoutte F, Gourdon J.** 2001. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* **119**, 59–67.
- Buchner P, Hawkesford MJ.** 2014. Complex phylogeny and gene expression patterns of members of the NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family (NPF) in wheat. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5697–5710.
- Calderini DF, Slafer GA.** 1998. Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. *Field Crops Research* **57**, 335–347.
- Calderini DF, Torres-León S, Slafer GA.** 1995. Consequences of wheat breeding on nitrogen and phosphorus yield, grain nitrogen and phosphorus concentration and associated traits. *Annals of Botany* **76**, 315–322.
- Cao Y, Fan XR, Sun SB, Xu GH, Hu J, Shen QR.** 2008. Effect of nitrate on activities and transcript levels of Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase in Rice. *Pedosphere* **18**, 664–673.
- Carillo P, Mastrolonardo G, Nacca F, Fuggi A.** 2005. Nitrate reductase in durum wheat seedlings as affected by nitrate nutrition and salinity. *Functional Plant Biology* **32**, 209–219.
- Castle SL, Randall PJ.** 1987. Effects of sulfur deficiency on the synthesis and accumulation of proteins in the developing wheat seed. *Functional Plant Biology* **14**, 503–516.
- Cox MC, Qualset CO, Rains DW.** 1985. Genetic variation for nitrogen assimilation and translocation in wheat. II. Nitrogen assimilation in relation to grain yield and protein. *Crop Science* **25**, 435–440.
- Cox MC, Qualset CO, Rains DW.** 1986. Genetic variation for nitrogen assimilation and translocation in wheat. III. Nitrogen translocation in relation to grain yield and protein. *Crop Science* **26**, 737–740.
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M.** 2006. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**, 1574–1588.
- Feil B.** 1997. The inverse yield–protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends in Agronomy* **1**, 103–119.
- Gaju O, Allard V, Martre P, et al.** 2011. Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Research* **123**, 139–152.
- Garnett T, Conn V, Plett D, et al.** 2013. The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. *New Phytologist* **198**, 82–94.
- Glass ADM.** 2009. Nitrate uptake by plant roots. *Botany* **87**, 659–667.
- Gooding MJ, Davies WP.** 1992. Foliar urea fertilization of cereals: a review. *Fertilizer Research* **32**, 209–222.

- Gooding MJ, Gregory PJ, Ford KE, Ruske RE.** 2007. Recovery of nitrogen from different sources following applications to winter wheat at and after anthesis. *Field Crops Research* **100**, 143–154.
- Le Gouis J, Béghin D, Heumez E, Pluchard P.** 2000. Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy* **12**, 163–173.
- Groos C, Robert N, Bervas E, Charmet G.** 2003. Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 1032–1040.
- Imssande J, Touraine B.** 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* **105**, 3.
- Justes E, Mary B, Meynard JM, Machet JM, Thelier-Huche L.** 1994. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* **74**, 397–407.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J.** 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* **102**, 22–32.
- King BJ, Siddiqi MY, Ruth TJ, Warner RL, Glass AD.** 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiology* **102**, 1279–1286.
- Koekemoer FP, Labuschagne MT, Van Deventer CS.** 1999. A selection strategy for combining high grain yield and high protein content in South African wheat cultivars. *Cereal Research Communications*, 107–114.
- Lemaire G, Gastal F.** 1997. N uptake and distribution in plant canopies. *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 3–43.
- Maathuis FJ.** 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 250–258.
- Martre P.** 2003. Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology* **133**, 1959–1967.
- Martre P, Jamieson PD, Semenov MA, Zyskowski RF, Porter JR, Tribou E.** 2006. Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 138–154.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- Mattsson M, Lundborg T, Larsson M, Larsson C-M.** 1992. Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth III. Post-anthesis kinetics of net nitrate uptake and the role of the relative root size in determining the capacity for nitrate acquisition. *Journal of Experimental Botany* **43**, 25–30.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Monaghan JM, Snape JW, Chojecki AJS, Kettlewell PS.** 2001. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica* **122**, 309–317.
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass AD, Touraine B.** 2003. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant molecular biology* **52**, 689–703.
- Olesen JE, Berntsen J, Hansen EM, Petersen BM, Petersen J.** 2002. Crop nitrogen demand and canopy area expansion in winter wheat during vegetative growth. *European Journal of Agronomy* **16**, 279–294.
- Oscarson P.** 1996. Transport of recently assimilated ¹⁵N nitrogen to individual spikelets in spring wheat grown in culture solution. *Annals of Botany* **78**, 479–488.
- Oscarson P.** 2000. The strategy of the wheat plant in acclimating growth and grain production to nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1921–1929.
- Oscarson P, Lundborg T, Larsson CM.** 1995a. Genotypic differences in nitrate uptake and nitrogen utilization for spring wheat grown hydroponically. *Crop Science* **35**, 1056–1062.
- Oscarson P, Lundborg T, Larsson M, Larsson C-M.** 1995b. Fate and effects on yield components of extra applications of nitrogen on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in solution culture. *Plant and Soil* **175**, 179–188.

- Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Pluchard P, Rousset M, Galic N.** 2003. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program [*Triticum aestivum* L.]. *Journal of Genetics and Breeding* **57**.
- Oury F-X, Godin C.** 2007. Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica* **157**, 45–57.
- Palta JA, Fillery IRP.** 1995. N application enhances remobilization and reduces losses of pre-anthesis N in wheat grown on a duplex soil. *Australian Journal of Agricultural Research* **46**, 519–531.
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M.** 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology* **10**, 11.
- Pfaffl MW.** 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR* **1**, 89–113.
- R Core Team.** 2012. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Ren Y, He X, Liu D, Li J, Zhao X, Li B, Tong Y, Zhang A, Li Z.** 2012. Major quantitative trait loci for seminal root morphology of wheat seedlings. *Molecular Breeding* **30**, 139–148.
- Rothstein SJ.** 2007. Returning to our roots: making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *Plant Cell* **19**, 2695–2699.
- Sadras VO, Rodriguez D.** 2010. Modelling the nitrogen-driven trade-off between nitrogen utilisation efficiency and water use efficiency of wheat in eastern Australia. *Field Crops Research* **118**, 297–305.
- Van Sanford DA, MacKown CT.** 1987. Cultivar differences in nitrogen remobilization during grain fill in soft red winter wheat. *Crop science* **27**, 295–300.
- Shewry PR.** 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science* **46**, 239–250.
- Siddiqi MY, Glass AD, Ruth TJ, Rufty TW.** 1990. Studies of the uptake of nitrate in barley I. kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. *Plant Physiology* **93**, 1426–1432.
- Simmonds NW.** 1995. The relation between yield and protein in cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **67**, 309–315.
- Taulemesse F, Le Gouis J, Gouache D, Gibon Y, Allard V.** 2015. Post-flowering nitrate uptake in wheat is controlled by N status at flowering, with a putative major role of root nitrate transporter NRT2.1 (H Yang, Ed.). *PLoS one* **10**, e0120291.
- Tottman DR, Makepeace RJ, Broad H.** 1979. An explanation of the decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Biology* **93**, 221–234.
- Triboi E, Martre P, Girousse C, Ravel C, Triboi-Blondel A-M.** 2006. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 108–118.
- Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**, 2290–2300.
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD.** 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**, 307–318.
- Waldren RP, Flowerday AD.** 1979. Growth stages and distribution of dry matter, N, P, and K in winter wheat. *Agronomy Journal* **71**, 391–397.
- Wang R.** 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**, 2512–2522.
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM.** 2000. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell Online* **12**, 1491–1509.
- Wang P, Wang Z, Cai R, Li Y, Chen X, Yin Y.** 2011. Physiological and molecular response of wheat roots to nitrate supply in seedling stage. *Agricultural Sciences in China* **10**, 695–704.

Yin L-P, Li P, Wen B, Taylor D, Berry JO. 2007. Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (TaNRT2.1) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other NTR2 genes. *Plant Science* **172**, 621–631.

Chapitre 6. Chez le blé tendre, la concentration en azote des grains est fortement corrélée à l'absorption d'azote post-floraison précoce en conditions de culture au champ

I Avant-propos

L'étude présentée dans le chapitre 5 a permis de mettre en évidence l'importance capitale de l'absorption d'azote post-floraison précoce sur la concentration en protéines des grains et de proposer des marqueurs physiologiques et moléculaires du GPD. Dans ce chapitre 6, une étude réalisée au champ est proposée pour confirmer la pertinence des marqueurs associés à la concentration en protéines en conditions contrôlées. Ce chapitre est rédigé sous forme d'article bien que nous ne souhaitions pas le soumettre à publication.

II Résumé

Chez le blé tendre, la concentration en protéines des grains (GPC) est un critère qualitatif majeur. Bien que de nombreuses études aient mis en évidence un effet positif de l'absorption d'azote post-floraison (PANU) sur la GPC, les déterminismes de ce caractère sont encore peu connus. Des expérimentations en conditions semi-hydroponiques basées sur des génotypes connus pour présenter des teneurs en protéines contrastées ont permis de mieux comprendre les mécanismes fins de régulation de la PANU intervenant chez le blé. Ce type d'approche a également mis en évidence l'impact majeur de l'absorption post-floraison précoce (PANU_{précoce}) intervenant dans les 250 degrés-jours après floraison sur la GPC indépendamment du niveau de rendement. Des marqueurs physiologiques et moléculaires associés à de forts niveaux de PANU_{précoce} et donc de GPC ont aussi été proposés. Cependant, ces résultats ont été observés en conditions de culture semi-hydroponiques très différentes des conditions de culture classiques, et doivent nécessairement être validés au champ avant d'entrevoir la possibilité d'utiliser de tels critères en sélection. La présente étude a pour objectif de tester l'effet de la PANU_{précoce} sur le GPC en conditions de culture au champ. Cette étude est basée sur le génotype Récital exposé à quatre modalités azotées permettant de distinguer les effets du statut azoté à floraison et de la disponibilité de l'azote après floraison sur la GPC. Cette approche a permis de mettre en évidence que la PANU_{précoce} était fortement corrélée à la GPC dans des conditions de culture au champ. L'impact de la PANU_{précoce} sur la GPC au champ semble être supérieur à ce qui avait été précédemment observé en conditions hydroponiques. De plus, le statut azoté des plantes à floraison influence la PANU_{précoce} dans les deux systèmes de culture, suggérant que les mécanismes fins de régulation de l'absorption et de l'assimilation d'azote opèrent de la même manière dans les deux environnements.

III Introduction

Le rendement en grains et la concentration en protéines sont des objectifs majeurs des programmes de sélection du blé tendre (*Triticum aestivum* L.), mais ces traits sont complexes à concilier du fait de la forte relation négative existant entre eux (Simmonds, 1995; Feil, 1997; Monaghan *et al.*, 2001; Triboi *et al.*, 2006; Oury and Godin, 2007). Les importantes augmentations de rendement intervenues en Europe au cours du 20^{ème} siècle ont ainsi été associées à une baisse progressive de la concentration en protéines (Le Buanec, 1999; Oury *et al.*, 2003; Triboi *et al.*, 2006; Jeuffroy and Oury, 2012 ; Amiri *et al.*, 2015). En 2014, les niveaux moyens de concentration en protéines des blés français de 11,1% (FranceAgriMer, 2014) ont tout juste atteint les seuils requis pour les débouchés industriels et les marchés d'exportation, malgré la généralisation de mise en culture de variétés à forts potentiels protéiques ainsi que la généralisation de la pratique d'un apport d'azote tardif favorable à la concentration en protéine des grains (Agreste, 2008). Les attentes environnementales relatives à la limitation des impacts agricoles sur les milieux naturels étant fortes, l'alternative d'une augmentation des concentrations en protéines par une intensification de la fertilisation doit être bien réfléchie. Le levier génétique reste alors la principale cible pour améliorer ce trait d'intérêt.

Plusieurs approches prometteuses sont mises en œuvre pour améliorer le potentiel génétique des variétés à accumuler des protéines du grain. Parmi celles-ci, une alternative intéressante permettant d'améliorer à la fois le rendement et la concentration en protéines a été proposée par Monaghan *et al.* (2001), basée sur le phénomène de déviation robuste de certains génotypes à la relation moyenne entre concentration en protéines et rendement (« Grain Protein Deviation » ou GPD) (Oury *et al.*, 2003; Oury and Godin, 2007). Le GPD, représentant la variabilité génétique de la capacité à accumuler des protéines dans les grains à un niveau de rendement donné, est fortement corrélé à la capacité des génotypes à absorber de l'azote après floraison indépendamment de la quantité d'azote absorbé avant floraison (Bogard *et al.*, 2010). Ce résultat tend à conférer un rôle majeur au déterminisme génétique de la satiété pour l'azote dans l'élaboration de la concentration en protéines. Une définition de la satiété en azote a été proposée par Taulemesse *et al.* (soumis) comme étant la capacité maximale des plantes à accumuler de l'azote, correspondant à la courbe de dilution maximale d'azote décrite par Justes *et al.* (1994) pour la phase végétative.

L'étude fine de la dynamique d'absorption post-floraison (Post-anthesis N uptake, PANU) a permis de mettre en évidence sa régulation complexe en conditions azotées non-limitantes, à la fois influencée par le statut azoté de la plante à floraison et par la demande en azote exercée par les grains en croissance (Taulemesse *et al.*, 2015). La décomposition de la PANU en différentes phases a également montré que l'absorption post-floraison précoce (PANU_{précocce}) intervenant dans les 250 degrés-jours (°CJ) après floraison était positivement corrélée à la concentration en azote du grain à maturité (Taulemesse *et al.*, soumis). Cette contribution forte de la quantité d'azote absorbée dans les jours suivant la floraison dans l'élaboration de la concentration en protéines des grains avait été précédemment suspectée au champ, suite à l'observation du déterminisme précoce du GPD (Bogard *et al.*, 2010). Au niveau

physiologique, la variabilité des capacités de stockage d'azote dans les parties végétatives influençant potentiellement la demande pour l'azote au travers de la force de puits a été proposée comme un facteur déterminant de la PANU (Martre *et al.*, 2006; Martre *et al.*, 2015; Taulemesse *et al.*, soumis). Cette hypothèse est soutenue par la forte capacité de la plante de blé à absorber l'azote malgré des disponibilités très faibles de l'élément dans le milieu en conditions hydroponiques (Oscarson *et al.*, 1995a), qui implique que la disponibilité intrinsèque de l'élément dans le milieu n'est *a priori* pas un élément majeur de limitation de la PANU lorsque les conditions environnementales sont favorables à l'absorption.

Les mécanismes fins de régulation de l'absorption et de l'assimilation de l'azote ont largement été étudiés chez les espèces modèles, notamment *Arabidopsis thaliana* (voir pour synthèses Miller *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007; Glass, 2009; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Ces travaux ont mis en évidence que l'absorption est régulée à l'échelle moléculaire, particulièrement au travers de l'expression de gènes codant pour des transporteurs d'azote racinaires appartenant aux familles des NRT1 et NRT2. Bien que seul un nombre restreint d'homologues de ces gènes soit actuellement connu chez le blé, l'implication dans la PANU de l'un d'entre eux, *NRT2.1*, a été montrée par des approches corrélatives (Taulemesse *et al.*, 2015; Taulemesse *et al.*, soumis). Par ailleurs, les niveaux d'expression des gènes *NRT2.1*, *NR* et *GS2* respectivement impliqués dans l'absorption, la réduction et l'assimilation de l'azote, sont négativement corrélés à la concentration en nitrate des racines qui a ainsi été suggérée comme un indicateur de l'état de satiété de la plante (Taulemesse *et al.*, soumis).

L'effet positif de l'azote absorbé après floraison sur la concentration en protéines des grains a largement été mis en évidence dans la littérature, que ce soit dans des conditions de culture au champ (Van Sanford and MacKown, 1987; Gooding and Davies, 1992; Monaghan *et al.*, 2001; Kichey *et al.*, 2007; Gooding *et al.*, 2007) ou dans des conditions contrôlées (Oscarson *et al.*, 1995b; Taulemesse *et al.*, soumis). Cependant, la proportion d'azote des grains issue de la PANU est soumise à de forts effets environnementaux. La part d'azote du grain issue de la PANU est en effet très variable, oscillant entre 5 et 40% en conditions de culture au champ (Cox *et al.*, 1986; Palta and Fillery, 1995; Kichey *et al.*, 2007) et atteignant la totalité de l'azote du grain en conditions contrôlées non limitantes pour l'azote, malgré des quantités très élevées de protéines accumulées (Taulemesse *et al.*, 2015). Cette grande variabilité de PANU induite par l'environnement de culture implique que l'impact majeur de la PANU_{précoce} sur la concentration en protéines des grains, mise en évidence en conditions contrôlées, n'ait pas nécessairement la même portée dans des conditions de culture au champ.

Dans cette optique, la présente étude a pour objectif d'observer l'effet de la PANU_{précoce} sur la concentration en protéines des grains en conditions de culture au champ, et ce sous divers niveaux de fertilisation azotée pré- et post-floraison. Cette étude s'appuie sur le génotype Récital, conduit à deux niveaux d'azote pré-floraison et deux niveaux d'azote post-floraison choisis de manière à permettre la comparaison avec les modalités azotées précédemment testées en conditions semi-hydroponiques (Taulemesse *et al.*, 2015; Taulemesse *et al.*, soumis). Cette étude est cependant uniquement focalisée sur des mesures physiologiques et n'implique pas d'analyses biochimique et moléculaire.

IV Matériel et méthodes

4.1. Matériel végétal

Douze micro-parcelles de six mètres carrés (longueur cinq mètres linéaires, largeur huit rangs ; inter-rang 15 centimètres) de cv. Récital ont été semées au champ le 9 novembre 2012 à Clermont-Ferrand, avec une densité de semis de 300 grains par mètre carré. La parcelle d'essai a été équipée d'un système d'irrigation de type Sprinkler et l'irrigation a été pilotée de manière à éviter les stress hydriques. En l'absence de précipitations, la parcelle a été irriguée (20 mm) après les apports d'azote afin d'assurer leur valorisation. Les micro-parcelles expérimentales ont également fait l'objet de traitements herbicides, fongicides et insecticides assurant une protection phytosanitaire optimale.

4.2. Modalités azotées

Quatre modalités de fertilisation azotée ont été testées au sein d'un dispositif expérimental en trois blocs randomisés. Ces modalités représentent les quatre combinaisons possibles entre deux niveaux de fertilisation azotée appliqués durant la phase pré-floraison (N- et N+) et deux niveaux de fertilisation azotée appliqués durant la phase post-floraison (LN et HN).

Au cours de la phase pré-floraison, six micro-parcelles ont été concernées par le traitement N- et les six autres par le traitement N+. Ces traitements ont respectivement consisté en des apports d'ammonitrate (33,5% d'azote) de 107,5 g et 358,3 g par micro-parcelle, correspondant à des doses d'azote de 60 et 200 kg N par hectare respectivement. Dans le cas du traitement N-, l'intégralité de la dose d'azote a été appliquée au stade épi 1 cm (GS30), tandis que cette dernière a été fractionnée en trois apports pour le traitement N+ : deux apports de 60 kg N par hectare aux stades tallage (GS21) et GS30, suivis d'un troisième apport de 80 kg N par hectare au stade deux nœuds (GS32).

A partir du stade floraison (GS65), intervenu les 15 et 16 mai 2013 en fonction des micro-parcelles, les deux traitements post-floraison LN et HN ont été appliqués chacun sur trois parcelles préalablement conduites en N- et trois parcelles préalablement conduites en N+. Le traitement LN correspond à un « zéro » azote sur la phase post-floraison, et n'a ainsi fait l'objet d'aucun apport. A l'inverse, le traitement HN correspond à une dose de 232,9 g d'ammonitrate par micro-parcelle (150 kg N par hectare) fractionnée en trois apports : le premier de 50 kg N par hectare à GS65, suivi de deux apports de 40 kg N par hectare aux stades GS65+200 degrés-jours (°CJ) et GS65+600 °CJ afin d'assurer une disponibilité de l'azote élevée durant tout le cycle de remplissage du grain. Cette méthodologie a conduit aux quatre modalités azotées N-LN, N-HN, N+LN et N+HN (Table 6-1 p.136).

Table 6-1: Détail des apports d'azote réalisés pour les quatre modalités azotées de l'étude. Les valeurs en caractères gras correspondent aux doses d'azote exprimées en kg d'azote par hectare (kg N), et les valeurs en caractères classiques correspondent à la masse d'ammonitrate correspondante (en grammes) apportée par micro-parcelle. Les stades de développement concernés par des apports d'azote ont été « tallage », « épi 1 cm », « 2 nœuds », « floraison », « floraison+400 °CJ » et « floraison+600 °CJ », correspondant respectivement aux stades GS21, GS30, GS32, GS65, GS65+400° CJ et GS65+600 °CJ de l'échelle de Zadok.

Traitement	GS21	GS30	GS32	GS65	GS65 +200° CJ	GS65 +600° CJ
N- LN	-	60 kg N	-	-	-	-
	-	107,5 g	-	-	-	-
N- HN	-	60 kg N	-	50 kg N	40 kg N	40 kg N
	-	107,5 g	-	89,6 g	71,6 g	71,6 g
N+ LN	60 kg N	60 kg N	80 kg N	-	-	-
	107,5 g	107,5 g	143,3 g	-	-	-
N+ HN	60 kg N	60 kg N	80 kg N	50 kg N	40 kg N	40 kg N
	107,5 g	107,5 g	143,3 g	89,6 g	71,6 g	71,6 g

4.3. Méthodologie de prélèvement et traitement des échantillons

Quatre prélèvements destructifs ont été réalisés aux stades GS65, GS65+250 °CJ, GS65+450 °CJ et GS92 sur chacune des 12 micro-parcelles. Chaque croisement statistique modalité azotée x date de prélèvement comptait trois répétitions biologiques, à raison d'une répétition par bloc. Les prélèvements ont été réalisés sur des placettes de 0,3 mètres carrés (50 cm linéaire sur les quatre rangs centraux des micro-parcelles) à l'aide de tondeuses permettant de sectionner la base des tiges des plantes. Les bottillons prélevés sur les placettes de 0,3 m² ont été individuellement pesés en matière fraîche (MF), puis sous-échantillonnés de manière à ne conserver qu'environ 25% de la MF du bottillon de départ. Les sous-échantillons ont également été pesés, et le nombre de talles qu'ils contenaient a été comptabilisé. Des mesures plus fines ont ensuite été réalisées sur un sous-set de 20 talles de chaque sous-échantillon. Les différents organes de ces talles ont été séparés en cinq compartiments (feuilles vertes, feuilles sèches, tiges, grains et balles), hormis au stade floraison pour lequel les épis n'ont pas été séparés en grains et balles. La surface foliaire verte a été mesurée (planimètre LI-3100, LI-COR, Lincoln NE, Etats-Unis), puis les différents échantillons ont été étuvés pendant 48 heures à 60°C avant d'être pesés en matière sèche. Les échantillons ont ensuite été broyés finement à l'aide d'un broyeur à billes, puis leurs concentrations en azote total ont été mesurées par la méthode de combustion Dumas à l'aide d'un analyseur CNS Flash EA 1112 Series (ThermoFisher Scientific, Waltham MA, Etats-Unis).

4.4. Indice de nutrition azotée

L'indice de nutrition azotée (INN) a été calculé comme la concentration en azote des parties aériennes divisée par la concentration en azote critique de la plante, définie comme la concentration en azote minimale des tissus requise pour assurer un rythme de croissance maximal (Lemaire and Gastal, 1997). La concentration azotée critique de la plante a été calculée selon l'équation décrite pour le blé par (Justes *et al.*, 1994).

4.5. PANU et remobilisation azotée

La quantité d'azote absorbée après floraison a été calculée par différence entre les quantités d'azote totales des plantes mesurées à maturité (GS92) et à floraison (GS65). De la même manière, la quantification de l'absorption précoce a été calculée par différence entre les stades GS65+250 °CJ et GS65.

La remobilisation d'azote des parties végétatives a été calculée par différence entre les quantités d'azote contenus dans les organes végétatifs (tiges, feuilles, balles) à GS65 et à GS92.

4.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R v2.15.1 (R Core Team, 2012) après une conversion des données à l'échelle du mètre carré sur la base (1) de la surface de la placette prélevée, (2) du rapport massique entre le bottillon prélevé et son sous-échantillon et (3) du nombre de talles du sous-échantillon.

V Résultats

5.1. Statuts azotés à floraison

Les traitements azotés N- et N+ appliqués durant la phase pré-floraison ont conduit à des statuts azotés contrastés à floraison. Les variables de nombre d'épi par mètre carré ($p=0,002$), surface foliaire ($p=0,001$), biomasse totale ($p=0,002$), concentration en azote des plantes ($p<0,001$), quantité d'azote totale ($p<0,001$) et INN ($p<0,001$) ont toutes été significativement affectées par la disponibilité de l'azote au cours du développement végétatif (Table 6-2 p.138). En moyenne, le traitement N- a conduit à des diminutions du nombre d'épis par mètre carré de 18%, de la biomasse totale et la teneur en azote d'environ 30%, et la surface foliaire, l'INN et la quantité d'azote totale de 40 à 50% en comparaison au traitement N+.

Table 6-2 : Nombre d'épis par mètre carré, surface foliaire, biomasse totale, concentration en azote des parties aériennes, quantité d'azote totale et indice de nutrition azoté (INN) à floraison pour les deux traitements pré-floraison contrastés N- et N+. Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions biologiques \pm l'erreur standard. Les groupes statistiques, représentés par les lettres en italique, sont issus du test post-ANAVAR Tukey HSD.

Azote	Nombre d'épis par m ² \pm SE	Surface foliaire (m ² m ⁻²) \pm SE	Biomasse totale (g m ⁻²) \pm SE	Concentration en azote (%MS) \pm SE	Quantité d'azote totale (g m ⁻²) \pm SE	NNI \pm SE
N-	477 \pm 8 <i>b</i>	3,52 \pm 0,18 <i>b</i>	824 \pm 60 <i>b</i>	1,33 \pm 0,08 <i>b</i>	10,94 \pm 0,83 <i>b</i>	0,63 \pm 0,04 <i>b</i>
N+	580 \pm 21 <i>a</i>	6,21 \pm 0,39 <i>a</i>	1112 \pm 53 <i>a</i>	1,87 \pm 0,04 <i>a</i>	20,73 \pm 0,78 <i>a</i>	1,01 \pm 0,02 <i>a</i>

Sans tenir compte de la minéralisation printanière, les plantes exposées au traitement N- ont absorbé à floraison l'équivalent des 60 kg N apportés et des 50 kg N de reliquat sortie hiver (RSH) durant leur développement végétatif (quantité d'azote absorbé à floraison de 10,94 g m⁻²), confirmant le caractère limitant de ce traitement. A l'inverse, les plantes exposées au traitement N+ n'ont absorbé que 82% du cumul d'azote apporté et de RSH (250 kg d'azote par hectare disponibles, quantité d'azote absorbé à floraison de 20,3 g m⁻²), suggérant qu'un résidu azoté conséquent était encore disponible à floraison. Ce constat corrobore ainsi l'hypothèse selon laquelle le traitement N+ n'a pas été limitant en azote dans les conditions pédoclimatiques de cet essai.

5.2. Composantes agronomiques à maturité

Au stade floraison, trois micro-parcelles conduites en N- et trois micro-parcelles conduites en N+ au cours de la phase pré-floraison ont été exposées à des conditions de faible (LN) ou de forte (HN) disponibilités en azote durant la phase post-floraison. Ce protocole a permis d'observer les effets dissociés du statut azoté à floraison et de la disponibilité de l'azote post-

floraison sur les variables agronomiques à maturité (Table 6-3 p.139). Les variables agronomiques de rendement, concentration en azote des grains et quantité d'azote des grains à maturité ont toutes été influencés par les traitements azotés. Cependant, les impacts des traitements pré-floraison et post-floraison ont différé selon les variables.

Le rendement a principalement été impacté par le traitement pré-floraison ($p=0.016$), sans effet significatif du traitement post-floraison ($p=0.155$). En moyenne, le traitement N- a occasionné une baisse de rendement de 27%, mettant en évidence l'effet fort de la carence pré-floraison sur l'établissement de ses composantes.

La concentration en azote des grains a quant à elle été à la fois influencée par le traitement azoté pré-floraison ($p=0,032$) et par le traitement post-floraison ($p<0,001$). Le traitement N- a engendré des diminutions moyennes de 0,11 points de concentration en azote des grains vis-à-vis du traitement N+, et le traitement LN des diminutions moyennes de 0,53 points de concentration en azote des grains vis-à-vis du traitement HN. L'effet de la carence azotée sur la concentration en azote des grains a ainsi été bien plus marqué après floraison. Cette variable fut également soumise à un effet d'interaction entre les traitements azotés pré- et post-floraison ($p=0,009$) révélant une variabilité de réponse au traitement azoté post-floraison en fonction du statut azoté à floraison. En ce sens, l'impact du traitement LN a moins pénalisé la concentration en azote des grains chez les plantes soumises au traitement N+ avant floraison, du fait de leur statut azoté fort à floraison associé à un potentiel de remobilisation important. A l'inverse, les plantes soumises au traitement HN ont présenté de plus fortes concentrations en azote des grains lorsqu'elles ont été précédemment soumises au traitement pré-floraison N-, associé à un potentiel de rendement faible.

La quantité d'azote totale des grains, produit du rendement et de la concentration en azote des grains, a logiquement été à la fois impactée par les traitements azotés pré- et post-floraison ($p=0,013$ et $p=0,014$ respectivement).

Table 6-3 : Rendement grains, concentration en azote des grains, quantité d'azote des grains, absorption d'azote post-floraison et quantité d'azote remobilisée à maturité pour les quatre modalités azotées de l'expérimentation. Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions biologiques \pm l'erreur standard. Les groupes statistiques, représentés par les lettres en italique, sont issus du test post-ANAVAR Tukey HSD.

Azote	Rendement grains (g m ⁻²) \pm SE	Concentration en azote des grains (%MS) \pm SE	Quantité d'azote des grains (g m ⁻²) \pm SE	PANU (g m ⁻²) \pm SE	Quantité d'azote remobilisé (g m ⁻²) \pm SE
N- LN	570 \pm 39 <i>b</i>	1,44 \pm 0,03 <i>c</i>	8,17 \pm 0,37 <i>b</i>	-0,24 \pm 0,26 <i>b</i>	6,36 \pm 0,96 <i>b</i>
N- HN	684 \pm 39 <i>ab</i>	2,23 \pm 0,08 <i>a</i>	15,16 \pm 0,62 <i>a</i>	7,29 \pm 0,74 <i>a</i>	8,93 \pm 0,83 <i>b</i>
N+ LN	818 \pm 89 <i>a</i>	1,81 \pm 0,14 <i>b</i>	14,89 \pm 2,71 <i>a</i>	-2,58 \pm 2,95 <i>b</i>	16,37 \pm 1,84 <i>a</i>
N+ HN	896 \pm 48 <i>a</i>	2,08 \pm 0,04 <i>ab</i>	18,66 \pm 1,05 <i>a</i>	1,95 \pm 1,03 <i>ab</i>	16,37 \pm 0,12 <i>a</i>

5.3. Absorption post-floraison et remobilisation d'azote

La PANU a été influencée à la fois par les traitements pré- et post-floraison ($p=0,050$ et $p=0,010$ respectivement), révélant des impacts forts du statut à floraison et de la disponibilité de l'azote après floraison sur cette variable. En moyenne, les plantes soumises au traitement N-, autrement dit possédant un statut azoté faible à floraison, ont absorbé $3,84 \text{ gN m}^{-2}$ de plus que les plantes soumises au traitement N+. Les disponibilités en azote contrastées après floraison ont également engendré des différences conséquentes d'absorption, les plantes soumises au traitement HN ayant absorbé en moyenne $4,62 \text{ gN m}^{-2}$ de plus que celles soumises au traitement LN. La modalité présentant la PANU la plus élevée (N- HN, Table 6-3 p.139) associe des plantes ayant un statut azoté faible à floraison et à une forte disponibilité de l'azote après floraison. Les dynamiques d'absorption d'azote mesurées au cours de la phase post-floraison (Figure 6-1A p.141) ont mis en évidence une forte implication de la PANU_{précoc} dans la PANU dans nos conditions expérimentales. Certaines valeurs de PANU sont négatives à maturité, probablement du fait de pertes d'azote par volatilisation au cours de la sénescence foliaire couplées à des imprécisions de mesures. Les pertes d'azote par volatilisation étant d'autant plus fortes que la quantité d'azote absorbé à floraison est importante (Papakosta and Gagianas, 1991), il n'est pas surprenant que la modalité N+LN qui a eu peu d'azote disponible après floraison présente un bilan de PANU plus faible que les autres modalités.

La quantité d'azote remobilisée a été très dépendante du traitement azoté pré-floraison ($p=0,004$), sans influence significative du traitement post-floraison. Les plantes soumises au traitement N- ont en moyenne effectué des niveaux de remobilisation 50% inférieurs à ceux effectués par les plantes soumises au traitement N+ (Figure 6-1B p.141). La quantité d'azote absorbée à floraison a ainsi été le principal déterminant de la quantité d'azote remobilisée.

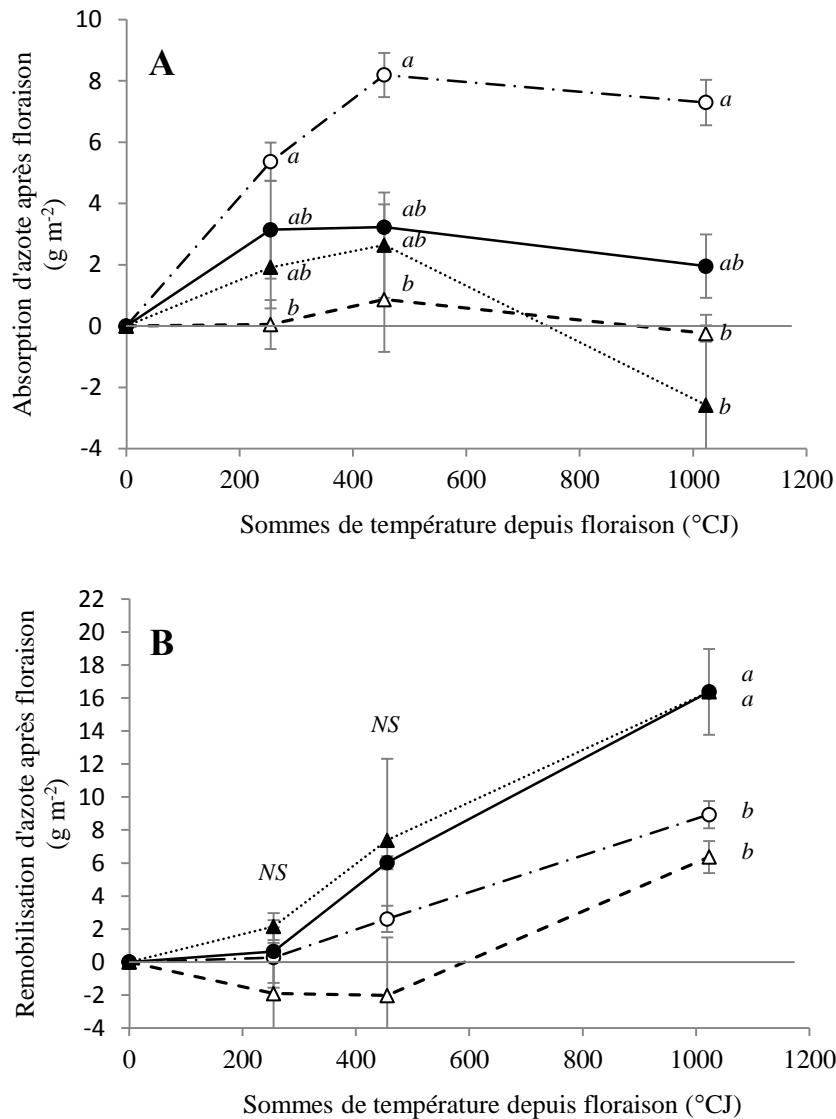


Figure 6-1 : Dynamiques d'absorption d'azote (**A**) et de remobilisation d'azote (**B**) observées pour les quatre modalités azotées de l'expérimentation au cours de la phase post-floraison. Les valeurs présentées sont des moyennes de trois répétitions biologiques \pm l'erreur standard pour les modalités N-LN (triangles blancs), N-HN (ronds blancs), N+LN (triangles noirs) et N+HN (ronds noirs). La ligne continue horizontale matérialise la valeur zéro. Les lettres en caractères italiques représentent les groupes statistiques fournis par le test HSD de Tukey.

5.4. Cinétique de concentration en azote des plantes

Les quatre prélèvements effectués en cinétique de floraison à maturité ont permis de décomposer la période post-floraison en trois phases afin de permettre une observation plus précise des effets du statut à floraison et de la disponibilité de l'azote après floraison sur l'évolution des paramètres physiologiques des plantes. Les traitements N- et N+ appliqués au

cours de la phase végétative ont conduit à des concentrations en azote des plantes contrastées à floraison (Figure 6-2 p.142). Les plantes soumises au traitement N+ avant floraison ont présenté une diminution soutenue de leur concentration en azote entre les stades floraison et GS65+450 °CJ, suivie d'une phase de diminution moins brutale de GS65+450 °CJ à maturité (Figure 6-2 p.142). Les traitements azotés post-floraison ont généralement peu impacté la dynamique de concentration en azote des plantes, hormis sur des stades tardifs où la modalité N+LN a présenté une décroissance plus marquée que la modalité N+HN.

Dans le cas des plantes soumises au traitement N- au cours de la phase pré-floraison, l'évolution de la concentration en azote au cours de la phase post-floraison a été dépendante du traitement azoté après floraison (Figure 6-2 p.142). Les plantes exposées à la modalité N-LN ont subi une décroissance soutenue de floraison à GS65+250 °CJ, qui s'est ensuite poursuivie de manière plus lente jusqu'à maturité. A l'inverse, les plantes soumises à la modalité N-HN, pour lesquelles de l'azote était disponible sur la phase post-floraison, ont maintenu leur concentration en azote entre les stades floraison et GS65+250 °CJ. Cette stabilisation de concentration en azote durant la phase précoce après floraison chez la modalité N-HN a conduit à un équilibrage des concentrations en azote avec les plantes conduites en N+ au cours de la phase pré-floraison. Sur la suite du cycle, l'évolution de concentration en azote des plantes de la modalité N-HN a été équivalente à celle observée chez les plantes soumises à la modalité N+HN.

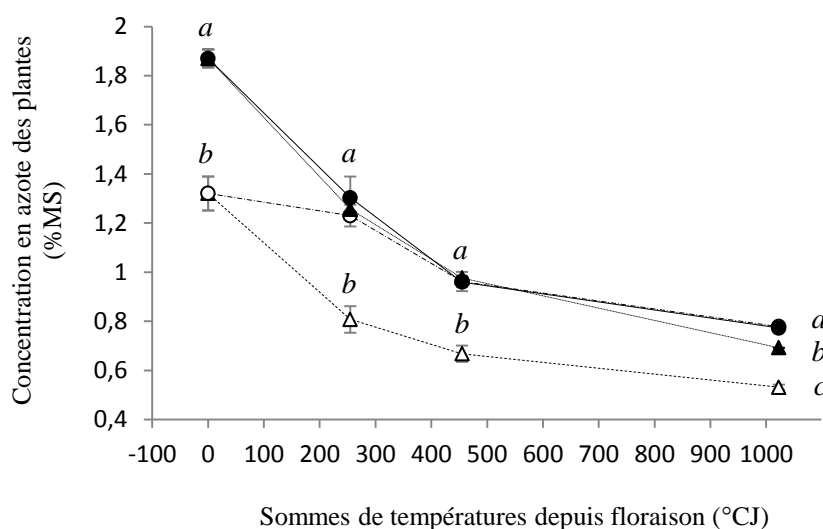


Figure 6-2 : Dynamiques des concentrations en azote des plantes soumises aux quatre modalités azotées de l'expérimentation au cours de la phase post-floraison. Les valeurs présentées sont des moyennes de trois répétitions biologiques \pm l'erreur standard pour les modalités N-LN (triangles blancs), N-HN (ronds blancs), N+LN (triangles noirs) et N+HN (ronds noirs). Les lettres en caractères italiques représentent les groupes statistiques fournis par le test HSD de Tukey.

5.5. Relation entre PANU et concentration en azote des grains

Dans cette étude, la concentration en azote des grains à maturité n'était pas corrélée à la PANU ($p=0,280$). Cependant, une forte corrélation a été observée entre la concentration en azote des grains à maturité et la PANU_{précoc} ($p=0,033$) (Figure 6-3A p.143). En moyenne, chaque gramme d'azote absorbé par mètre carré durant cette phase post-floraison précoc a été accompagné d'une augmentation de la concentration en azote des grains à maturité de 0,15 points.

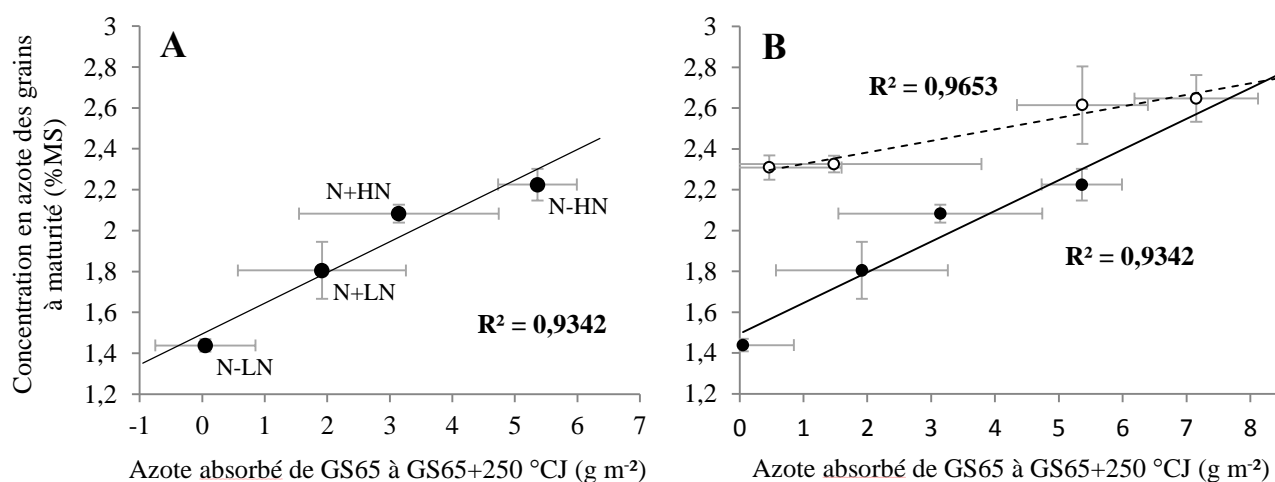


Figure 6-3 : Relation entre la quantité d'azote absorbée de GS65 à GS65+250 °CJ et la concentration en azote des grains à maturité. La relation est présentée pour les quatre modalités azotées de l'étude (A), ainsi qu'en superposition avec la courbe obtenue en conditions semi-hydroponiques avec quatre modalités azotées comparables (B) (Taulemesse *et al.*, soumis). Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions biologiques ± l'erreur standard pour les conditions de champ (cercles noirs), et sont les moyennes de cinq répétitions biologiques ± l'erreur standard pour les conditions semi-hydroponiques (cercles blancs).

La comparaison des relations positives entre PANU_{précoc} et concentration en azote des grains à maturité observées dans la présente étude et en conditions de culture contrôlée (Taulemesse *et al.*, soumis) est présentée en Figure 6-3B (p.143). La relation observée par Taulemesse *et al.* (soumis) en conditions contrôlées est basée sur un protocole de traitements azotés relativement comparables à celui employé dans cette étude, permettant d'effectuer un parallèle direct entre les deux modes de culture malgré les différences fortes de statuts azotés à floraison. Le comparatif de ces deux relations évoque clairement un effet plus marqué de la PANU_{précoc} sur la concentration en azote du grain à maturité dans des conditions de culture au champ. Tandis que chaque gramme d'azote par mètre carré supplémentaire absorbé sur la

phase précoce après floraison est associé à une augmentation moyenne de 0,06 points de concentration en azote des grains à maturité en conditions contrôlées, ce gramme d'azote supplémentaire par mètre carré est associé à une augmentation moyenne de 0,15 points en conditions de culture au champ. Cela représente une répercussion possiblement deux fois plus importante de la PANU_{précoce} sur la concentration en azote des grains à maturité au champ, qui doit toutefois être considérée avec précaution du fait des différences marquées de niveaux de base de concentration en azote des grains entre les deux systèmes de culture.

VI Discussion

6.1. Effets des traitements azotés

Les traitements azotés pratiqués au cours de la période pré-floraison ont conduit à des statuts azotés fortement contrastés à floraison. Selon l'équation de la courbe critique de teneur en azote des plantes ajustée pour le blé par Justes *et al.* (1994), les plantes soumises au traitement N- présentant un INN à floraison de 0,63 ont clairement été limitées par l'azote pour l'accumulation de biomasse. Au contraire, l'azote ne semble pas avoir été limitant pour les plantes exposées au traitement N+ qui présentaient un INN à floraison de 1,01. Bien que la valeur de l'INN à floraison soit insuffisante pour tirer des conclusions sur la disponibilité de l'azote tout au long du développement végétatif, elle n'en demeure pas moins un indicateur intéressant de l'état azoté des plantes après l'application des deux traitements. Les INN observés dans cette étude sont comparables aux valeurs généralement observées au champ pour la variété Récital dans des conditions de fort et faible azote (Laperche *et al.*, 2008).

Les traitements azotés appliqués après floraison ont également eu un effet détectable, bien que leurs effets aient été plus discrets. Ces derniers n'ont que très peu influencé la biomasse, mais ont significativement impacté la PANU, les concentrations en azote des grains et des plantes entières ainsi que la quantité totale d'azote des grains. Cependant, l'impact des traitements post-floraison a été quelque peu perturbé par le pouvoir tampon du sol. Dans ce sens, le traitement LN a clairement été limitant pour les plantes conduites en N- avant floraison, mais son effet sur les plantes conduites en N+ a été plus faible du fait de la présence d'un fort résidu azoté sur la parcelle à floraison. Pour des raisons inverses, le traitement HN a eu des effets plus marqués sur les plantes conduites en N-, qui étaient carencées en azote avant l'application du traitement.

Malgré les effets plus ou moins marqués des traitements post-floraison liés au pouvoir tampon du sol, les quatre modalités azotées ont différenciellement impacté les statuts azotés à floraison et les niveaux de disponibilité de l'azote après floraison. Cela s'est répercuté significativement sur les variables agronomiques. Cette configuration est favorable à l'observation de l'impact de la PANU sur la GPC.

6.2. Comparaison des conditions de cultures au champ et semi-hydroponiques

Que ce soit en termes de statuts à floraison ou de résultats agronomiques à maturité, les résultats obtenus dans la présente étude sont très inférieurs à ceux observés en conditions semi-hydroponiques (Taulemesse *et al.*, 2015 ; Taulemesse *et al.*, soumis). Sur la base des six variables mesurées à floraison (Table 6-2 p.138) et des trois traits agronomiques mesurés à maturité (Table 6-3 p.139), la modalité N+HN considérée comme non-limitante dans cette étude a été équivalente à celle considérée comme limitante en culture semi-hydroponique (4 mM de nitrates) (Taulemesse *et al.*, soumis). Ce constat met en évidence les fortes différences existant entre les deux systèmes de culture, probablement à la fois liées aux quantités variables d'azote apportées dans les deux systèmes et aux disparités de contraintes

environnementales. En conditions semi-hydroponiques, aucune variable climatique n'a réellement été limitante (disponibilité de l'eau, température ou humidité de l'air). A l'inverse, la composante environnementale a nécessairement été limitante en condition de culture au champ, du fait que la modalité N+HN n'ait pas accumulé plus d'azote malgré la forte disponibilité de l'élément. En conditions contrôlées, le génotype Récital a montré des capacités d'accumulation d'azote bien supérieures (Taulemesse *et al.*, 2015 ; Taulemesse *et al.*, soumis). Parmi les paramètres environnementaux probablement impliqués, la disponibilité de l'eau semble être un élément majeur de limitation de l'absorption d'azote. Il a en effet été montré qu'une diminution relativement faible de la disponibilité de l'eau (baisse de 30% de saturation de la capacité au champ au cours de la phase pré-floraison) réduisait de près de 50% l'absorption d'azote Cabrera-Bosquet *et al.* (2007).

Malgré les fortes différences induites par les conditions de culture, la hiérarchie de rendement entre les traitements est bien conservée au sein de chaque étude (Taulemesse *et al.*, 2015 ; Taulemesse *et al.*, soumis). Cela suggère que le schéma général de modalités azotées pré-floraison commun ait eu des impacts comparables dans les deux environnements. Le parallèle est cependant plus complexe à réaliser pour la GPC. Outre les fortes différences de niveaux, la réponse de cette variable aux traitements azotés est inverse entre les deux environnements de culture. En conditions de culture semi-hydroponique, les modalités présentant les plus forts niveaux de rendement sont également celles qui présentent les plus faibles GPC (Taulemesse *et al.*, 2015 ; Taulemesse *et al.*, soumis). Cela intervient indépendamment du traitement azoté post-floraison, suggérant l'existence d'une saturation des capacités de l'appareil assimilatoire à partir d'un certain niveau de rendement (Taulemesse *et al.*, 2015). A l'inverse, en conditions de culture au champ, les concentrations en azote des grains sont principalement dépendantes de la disponibilité de l'azote après floraison, suggérant que l'appareil assimilatoire ne soit pas limitant à ces niveaux de rendement. Ce point de divergence fondamental entre les deux études est un élément explicatif majeur des différences de hiérarchie des traitements vis-à-vis de la GPC.

Bien que des réponses contrastées de GPC aient été observées entre les deux systèmes de culture, ce trait présente de la variabilité dans les deux cas. La variabilité de GPC a été bien plus élevée dans la présente étude conduite au champ (0,79 points entre les modalités extrêmes) qu'en conditions semi-hydroponiques (0,34 points) (Taulemesse *et al.*, soumis). Cette variabilité importante de la GPC en conditions de culture au champ est favorable à la comparaison des déterminismes du GPC entre les deux systèmes de culture.

6.3. Contrôle de l'absorption d'azote

Lorsque la disponibilité de l'azote le permet, les concentrations en azote des plantes exposées aux traitements N- et N+ convergent rapidement vers une valeur commune. Cette convergence révèle que les plantes carencées à floraison (soumises au traitement N-) ont la capacité d'enrichir leurs tissus végétatifs en azote après floraison, jusqu'à atteindre un niveau de concentration azotée indépendant du potentiel de rendement. Le fait que ce niveau soit celui observé sur les plantes non carencées nous fait faire l'hypothèse qu'il s'agit d'un niveau « optimal » dans ces conditions pédoclimatiques. En effet, ces régulations de l'absorption

opèrent également chez les plantes bien pourvues (soumises au traitement N+), car leur statut azoté fort est associé à des niveaux d'absorption faibles malgré la présence d'azote disponible. Ce phénomène a déjà été observé en conditions semi-hydroponiques, avec une convergence rapide des concentrations en azote de plantes présentant des statuts azotés contrastés à floraison (Taulemesse *et al.*, 2015). Les niveaux de concentration en azote « optimaux » sont cependant dépendants de l'environnement de culture. En semi-hydroponique, les plantes convergent vers une concentration en azote d'environ 2 % MS qui reste ensuite stable jusqu'à maturité (Taulemesse *et al.*, 2015). En conditions de champ, lorsque l'azote n'est pas limitant après floraison, les concentrations en azote s'équilibrent aux alentours de 1,3 % MS à GS65+250 °CJ, mais présentent ensuite une décroissance indépendante du potentiel de rendement jusqu'à maturité. Ces différences s'expliquent probablement par des disparités de disponibilité de l'eau entre les deux systèmes de culture, car l'eau étant plus limitante au champ, la remobilisation d'azote depuis les parties végétatives intervient plus précocement.

En conditions de culture semi-hydroponiques, la corrélation positive entre les niveaux d'expression du gène codant pour le transporteur racinaire NRT2.1 et l'absorption d'azote a suggéré une implication forte du transporteur dans la convergence apparente des teneurs en azote des plantes (Taulemesse *et al.*, 2015). Il a également été observé que les statuts azotés des plantes conditionnaient fortement la concentration en nitrate des racines, et que ce trait était négativement corrélé aux niveaux d'expression du gène *NRT2.1*. Ces observations ont permis de bâtir l'hypothèse selon laquelle la concentration en nitrates des racines serait une voie de régulation de l'absorption d'azote, ainsi qu'un indicateur pertinent de l'état de satiété des plantes (Taulemesse *et al.*, 2015 ; Taulemesse *et al.*, soumis). Du fait que les dynamiques de convergence de concentrations en azote des plantes soient très comparables dans les deux conditions de culture, il est fort probable que les mécanismes de régulation de l'absorption d'azote observés en conditions contrôlées interviennent également dans des conditions de culture au champ. Les différences fortes de statuts azotés ainsi que de niveaux de disponibilité de l'azote entre les deux conditions de culture ne semblent pas modifier le mécanisme général de régulation de l'absorption.

6.4. Corrélation entre PANU_{précoce} et concentration en azote des grains

Dans des conditions de culture au champ, la variabilité génétique de PANU a été mise en évidence comme un déterminisme fort de la GPC (Monaghan *et al.*, 2001 ; Bogard *et al.*, 2010). L'étude plus précise des déterminismes physiologiques et moléculaires de la GPC en conditions contrôlées sur deux variétés connues pour être contrastées pour le GPD a permis de mettre en évidence que la PANU_{précoce} avait un impact majeur sur la GPC en l'absence de stress environnementaux (Taulemesse *et al.*, soumis). Conformément à ces observations, la PANU_{précoce} était fortement corrélée à la GPC dans la présente étude sur une variété, indépendamment des niveaux de rendement. L'impact de la quantité d'azote absorbé précocement après floraison sur la GPC a également été plus marqué au champ que ce qui avait précédemment été observé en conditions hydroponiques, suggérant que ce caractère ait

un impact supérieur lorsque les conditions environnementales sont moins favorables à l'absorption d'azote.

Dans la présente étude, la GPC mesurée à GS65+250 °CJ ($GPC_{\text{précoce}}$) était très fortement corrélée à la GPC mesurée à maturité ($r^2=0,966$, $p=0,017$, données non montrées), mettant en évidence un déterminisme précoce de ce trait. Sur la base de deux génotypes contrastés pour la GPC conduits en conditions contrôlées, la capacité à réaliser de la $PANU_{\text{précoce}}$ a influencé à la fois la GPC et la $GPC_{\text{précoce}}$, mais l'absorption d'azote tardive n'a pas eu d'influence significative sur la GPC (Taulemesse *et al.*, soumis). Ce constat suggère que la GPC puisse être indexée sur la $GPC_{\text{précoce}}$, indépendamment de la disponibilité en azote en fin de cycle et du niveau de rendement. Selon cette hypothèse, la variabilité génétique de $PANU_{\text{précoce}}$ pourrait représenter critère intéressant pour la sélection de génotypes présentant de forts potentiels protéiques, et ce indépendamment de leur niveau de rendement.

VII Conclusion

L'objectif de cette étude était d'identifier les déterminismes physiologiques de la GPC en conditions de culture au champ, dans l'optique de valider les marqueurs potentiels du GPD mis en évidence en conditions contrôlées. Sur la base d'un protocole permettant de faire varier indépendamment le statut azoté des plantes à floraison et la disponibilité de l'azote après floraison, nous avons montré que les mécanismes de régulation de la concentration en azote des plantes mis en évidence en conditions contrôlées opèrent de la même manière au champ. Cela suggère que les processus moléculaires impliqués dans la régulation de l'absorption d'azote après floraison répondent aux mêmes règles dans des environnements très contrastés. Au champ, la PANU_{précoce} a un impact marqué sur la GPC indépendamment du niveau de rendement, confirmant que ce trait puisse être un déterminisme fort du GPD. Les marqueurs physiologiques et moléculaires associés à la PANU_{précoce} dans des études antérieures devraient pouvoir permettre d'assister la sélection pour le GPD en conditions de culture au champ.

Références

- Agreste.** 2008. Enquête pratiques culturales en 2006. Agreste Informations **124**.
- Amiri R, Bahraminejad S, Sasani S, Jalali-Honarmand S, Fakhri R.** 2015. Bread wheat genetic variation for grain's protein, iron and zinc concentrations as uptake by their genetic ability. *European Journal of Agronomy* **67**, 20–26.
- Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J-M, Jeuffroy M-H, Gate P, Martre P, Le Gouis J.** 2010. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4303–4312.
- Cabrera-Bosquet L, Molero G, Bort J, Nogués S, Araus JL.** 2007. The combined effect of constant water deficit and nitrogen supply on WUE, NUE and $\Delta^{13}C$ in durum wheat potted plants. *Annals of Applied Biology* **151**, 277–289.
- Cox MC, Qualset CO, Rains DW.** 1986. Genetic Variation for Nitrogen Assimilation and Translocation in Wheat. III. Nitrogen Translocation in Relation to Grain Yield and Protein.
- Feil B.** 1997. The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends in Agronomy* **1**, 103–119.
- FranceAgriMer.** 2014. Qualité des blés français à l'entrée des silos de collecte. <http://www.franceagrimer.fr/>
- Glass ADM.** 2009. Nitrate uptake by plant roots. *Botany* **87**, 659–667.
- Gooding MJ, Davies WP.** 1992. Foliar urea fertilization of cereals: a review. *Fertilizer Research* **32**, 209–222.
- Gooding MJ, Gregory PJ, Ford KE, Ruske RE.** 2007. Recovery of nitrogen from different sources following applications to winter wheat at and after anthesis. *Field Crops Research* **100**, 143–154.
- Jeuffroy MH, Oury FX.** 2012. Impact des nouvelles techniques de production, impliquant de faibles niveaux d'intrants, sur la quantité de protéines du blé. *Innovations Agronomiques* **19**, 13–25.
- Justes E, Mary B, Meynard JM, Machet JM, Thelier-Huche L.** 1994. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* **74**, 397–407.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J.** 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers.
- Laperche A, Le Gouis J, Hanocq E, Brancourt-Hulmel M.** 2008. Modelling nitrogen stress with probe genotypes to assess genetic parameters and genetic determinism of winter wheat tolerance to nitrogen constraint. *Euphytica* **161**, 259–271.
- Le Buanec B.** 1999. Diversité génétique des variétés de blé tendre cultivées en France au cours du vingtième siècle. Evolution variétale, données techniques et économiques. *Comptes rendus de l'académie d'agriculture française* **85**, 37–53.
- Lemaire G, Gastal F.** 1997. N Uptake and Distribution in Plant Canopies - Springer.
- Martre P, He J, Le Gouis J, Semenov MA.** 2015. In silico system analysis of physiological traits determining grain yield and protein concentration for wheat as influenced by climate and crop management. *Journal of Experimental Botany*.
- Martre P, Jamieson PD, Semenov MA, Zyskowski RF, Porter JR, Tribou E.** 2006. Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 138–154.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gauffichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Monaghan JM, Snape JW, Chojecki AJS, Kettlewell PS.** 2001. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica* **122**, 309–317.

- Oscarson P, Lundborg T, Larsson CM.** 1995a. Genotypic differences in nitrate uptake and nitrogen utilization for spring wheat grown hydroponically. *Crop Science* **35**, 1056–1062.
- Oscarson P, Lundborg T, Larsson M, Larsson C-M.** 1995b. Fate and effects on yield components of extra applications of nitrogen on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in solution culture. *Plant and Soil* **175**, 179–188.
- Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Pluchard P, Rousset M, Galic N.** 2003. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program [*Triticum aestivum* L.]. *Journal of Genetics and Breeding* **57**.
- Oury F-X, Godin C.** 2007. Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica* **157**, 45–57.
- Palta JA, Fillery IRP.** 1995. N application enhances remobilization and reduces losses of pre-anthesis N in wheat grown on a duplex soil. *Australian Journal of Agricultural Research* **46**, 519–531.
- Papakosta DK, Gagianas AA.** 1991. Nitrogen and dry matter accumulation, remobilization, and losses for Mediterranean wheat during Grain Filling. *Agronomy Journal* **83**, 864.
- R Core Team.** 2012. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Van Sanford DA, MacKown CT.** 1987. Cultivar differences in nitrogen remobilization during grain fill in soft red winter wheat. *Crop science* **27**, 295–300.
- Simmonds NW.** 1995. The relation between yield and protein in cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **67**, 309–315.
- Taulemesse F, Le Gouis J, Gouache D, Gibon Y, Allard V.** Submitted 2015. Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) grain protein concentration is related to early post-flowering nitrate uptake under putative control of plant satiety level. *Journal of Experimental Botany*
- Taulemesse F, Le Gouis J, Gouache D, Gibon Y, Allard V.** 2015. Post-flowering nitrate uptake in wheat is controlled by N status at flowering, with a putative major role of root nitrate transporter NRT2.1 (H Yang, Ed.). *PLOS ONE* **10**, e0120291.
- Triboi E, Martre P, Girousse C, Ravel C, Triboi-Blondel A-M.** 2006. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 108–118.
- Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**, 2290–2300.

I Une approche génétique pour l'amélioration de la concentration en protéines

La concentration en protéines du blé étant à la fois fortement soumise aux facteurs environnementaux et génétiques, deux approches complémentaires peuvent être pratiquées pour viser l'amélioration de ce trait. L'approche agronomique a d'ores et déjà largement fait ses preuves, notamment au travers d'améliorations notables de la valorisation de l'azote en protéines du grain grâce aux programmes de fractionnement des apports d'azote. Clairement, le levier agronomique semble encore pouvoir apporter des résultats probants pour l'amélioration de la concentration en protéines des grains, du fait de l'influence forte de la disponibilité de l'azote sur ce trait (Altenbach *et al.*, 2003; Godfray *et al.*, 2010). Ce potentiel d'amélioration substantiel se situe d'une part à l'échelle des programmes de fertilisation, avec des optimisations possibles de la dose d'azote apportée, des stades phénologiques d'application des apports, de la forme des engrais utilisés, ou bien de la modulation de ces trois aspects en fonction des caractéristiques spécifiques des différentes variétés et environnements de culture avec des solutions de pilotage fin (indicateurs du statut azoté, agriculture de précision) et de prédiction à moyen terme (modèles de développement de la culture, prévision météorologiques). De plus, au-delà même de ces pratiques agronomiques qui prennent leur sens à l'échelle de la parcelle, un certain nombre de leviers agissant sur la gestion de l'azote à l'échelle supérieure (système, parcellaire) peuvent aussi avoir du sens dans un cadre fixant en même temps des objectifs de production de qualité et une minimisation des externalités négatives de la pratique agricole.

De fait, la résolution globale de cette question implique forcément des progrès simultanés aux différentes échelles de travail (système, parcelle, plante). Dans ce continuum, l'amélioration variétale est un levier d'importance capitale. Ce dernier semble particulièrement prometteur du fait de la variabilité génétique existante pour la concentration en protéines du grain (Vogel *et al.*, 1978 ; Snape *et al.*, 1993 ; Le Gouis *et al.* 2014). Bien que de nombreuses études s'y soient intéressées, le déterminisme génétique de ce caractère clé est à l'heure actuelle peu connu. La grande problématique sous-jacente à ce type d'étude est la forte relation négative existant entre le rendement et la concentration en protéines des grains (Simmonds, 1995; Feil, 1997; Monaghan *et al.*, 2001; Triboi *et al.*, 2006; Oury and Godin, 2007; Bogard *et al.*, 2010), relation au cœur de ce travail de thèse et qui implique que les génotypes présentant les plus fortes concentrations en protéines soient également ceux qui aient généralement les plus faibles niveaux de rendement. Qui plus est, l'effet génétique sur la concentration en protéines est soumis à de forts effets d'interaction avec l'environnement de culture (Oury *et al.*, 2003).

Le travail présenté dans cette thèse a été largement encouragé par des travaux antérieurs réalisés sur le GPD (pour rappel, Grain Protein Deviation). En effet, les résultats obtenus par Monaghan *et al.* (2001) et Oury and Godin (2007) qui mettent en évidence la déviation positive robuste de certains génotypes à la relation négative entre concentration en protéines

et rendement ont ouvert une piste de recherches du déterminisme de la concentration en protéines affranchie de l'effet du rendement. Plus récemment, les travaux de Bogard *et al.* (2010) visant à identifier les déterminismes génétiques et écophysiologiques du GPD ont montré le lien fort existant entre l'absorption post-floraison indépendante du statut à floraison et le GPD. Ces observations sous-entendent que l'effet génétique sur le contrôle de l'absorption post-floraison en lien avec la satiété pour l'azote est déterminant dans l'élaboration du GPD, et donc de la concentration en protéines indépendamment du niveau de rendement. Ce potentiel génotype-dépendant de capacité à produire des concentrations en protéines supérieures à la moyenne malgré un niveau de rendement comparable paraissait extrêmement prometteur dans l'optique de rompre la relation négative existant entre ces deux traits.

II Des travaux focalisés sur un processus physiologique plutôt qu'une approche gène candidat

Dans la littérature, beaucoup de travaux sont référencés sur l'amélioration génétique de la concentration en protéines, et certains d'entre eux se sont révélés particulièrement concluants. La plupart de ces travaux sont basés sur des approches de type « gène candidat » issus de travaux de génétique d'association, qui mettent en évidence l'effet de différents allèles sur la concentration en protéines ou d'autres variables de qualité boulangère. L'exemple le plus prometteur est sans aucun doute le polymorphisme allélique observé au niveau du QTL *Gpc-B1* déjà évoqué dans la synthèse bibliographique de cette thèse. La présence d'un allèle fonctionnel à ce locus augmente la concentration en protéines de 7 à 15% sans effet fortement délétère sur le rendement dans les conditions de culture et les fonds génétiques dans lesquels il a jusqu'à présent été testé (Uauy *et al.*, 2006; Tabbita *et al.*, 2013). Ces travaux sont très intéressants, et ils ont permis d'aboutir à une augmentation de la concentration en protéines des blés dans des variétés de blé de printemps inscrites aux USA ou au Canada. Cependant, les éventuelles pertes de rendement associées à l'accélération de la senescence dans du matériel hiver élite européen ne sont pas mesurables en l'état actuel des choses, et peuvent présenter un frein majeur à leur développement. Des études récentes ont également mis en évidence que l'effet positif d'un l'allèle fonctionnel au niveau du QTL *Gpc-B1* sur la concentration en protéines dans ce type de matériel était fortement dépendant du fond génétique (Le Gouis, communication personnelle).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons fait le choix d'une approche ciblant un processus physiologique identifié au préalable comme étant lié de manière robuste au caractère d'intérêt, plutôt que de se focaliser sur un gène candidat en particulier. L'approche « processus » offre l'opportunité de déterminer des traits (physiologiques ou moléculaires) associés à des variations observées de concentration en protéines qui pourraient rapidement être utilisés comme critères de sélection. Le choix d'une telle approche a largement été guidé par les travaux de Monaghan *et al.* (2001), Oury *et al.* (2003), Oury and Godin (2007) et Bogard *et al.* (2010), qui ont d'une part mis en évidence la pertinence d'utiliser le GPD en sélection, et d'autre part pointé du doigt les bases physiologiques de ce trait. Dans leurs travaux, le GPD présentait l'avantage d'être robuste à l'environnement et rapidement quantifiable chez tous les génotypes, avec pour seul inconvénient sa relativité vis-à-vis du panel de génotypes expérimentés. L'amélioration du GPD sous-entend une augmentation de la concentration indépendamment du potentiel de rendement. Cette distinction est très importante, car à l'inverse d'une approche ciblant la concentration en protéines seule, la recherche des déterminismes du GPD est, par définition, totalement affranchie des effets du rendement sur la concentration en protéines. Cette approche intègre à la fois l'effet différentiel de l'azote sur les deux traits et les effets pléiotropiques potentiels de certains gènes. Ainsi, sélectionner pour du GPD revient à sélectionner une forte capacité à accumuler des protéines dans le grain à un niveau de rendement comparable à la moyenne.

III Un dilemme entre recherche fondamentale de déterminismes génétiques et applications au champ

Le type d'approche mise en œuvre dans ces travaux de thèse est par nature comparative, et de ce fait, le problème du choix des génotypes testé se pose rapidement. Le choix du matériel végétal étudié est un dilemme existant dans bon nombre d'études en écophysiologie, avec d'un côté la nécessité d'explorer une diversité génétique large pour maximiser les chances de détecter des liens entre caractères, et de l'autre, le risque que les relations ainsi mises à jour ne s'appliquent plus dans une base génétique plus étroite centrée sur un matériel utilisable pour des objectifs finalisés. Dans notre cas, la recherche de « sécurité » pousse à choisir du matériel très fortement contrasté pour le trait d'intérêt et dont les comportements sont déjà bien connus dans des conditions contrôlées propices à la recherche fondamentale. Néanmoins, l'ambition de valorisation des travaux en recherche appliquée incite à expérimenter directement du matériel élite. En règle générale, les génotypes élites présentent moins de variabilité car tous sont issus d'un processus de sélection proche et peu adapté à l'émergence de types extrêmement différenciés. De plus, leur culture en conditions contrôlées peut se révéler hasardeuse si ce matériel n'a pas été l'objet d'études antérieures dans ces mêmes conditions. Typiquement, des précocités équivalentes au champ entre deux génotypes peuvent se présenter extrêmement différentes en conditions contrôlées. Dans le temps imparti pour réaliser ces travaux, nous avons opté pour la sécurité et avons de ce fait choisi du matériel végétal que nous maîtrisions relativement bien. Ainsi, nous concevons que le choix du matériel puisse porter à discussion, et que cela puisse laisser un sentiment de frustration vis-à-vis des résultats présentés. Néanmoins, les génotypes expérimentés dans cette étude, inscrits à la fin des années 1980, sont à l'interface entre les deux catégories évoquées car ils ne sont pas uniquement des « lignées de laboratoire » et ont été largement cultivés à des fins économiques du fait notamment de leur qualité d'utilisation, bien que cette époque commence à dater quelque peu. Certains systèmes de culture à bas niveaux d'intrants utilisent encore largement le génotype Renan. Bien évidemment, les marqueurs potentiels du GPD proposés dans cette étude devront être testés sur des génotypes modernes avant d'envisager une quelconque utilisation en sélection.

Des remarques du même ordre peuvent s'appliquer aux conditions de culture qui ont été employées dans le cadre de ces travaux. Nous avons également pris le parti de nous affranchir au maximum des effets environnementaux, en privilégiant des conditions semi-hydroponiques contrôlées permettant d'identifier plus clairement les mécanismes de régulation de l'absorption d'azote en fonction du statut azoté des plantes à floraison. Ce système de culture est évidemment très différent des conditions de culture au champ, rendant certains résultats obtenus difficilement généralisables directement du fait des niveaux de rendements et de concentrations en protéines atteints, largement supérieures aux valeurs généralement observées dans des conditions agronomiques classiques. L'aspect fondamental de ces recherches constitue selon nous une étape nécessaire dans la détermination de processus impliqués dans l'élaboration de caractères complexes tel que le GPD. Cependant, conscients de l'intérêt de valider au champ les marqueurs potentiels du GPD observés en conditions contrôlées, nous nous sommes attachés à réaliser une expérimentation dans des conditions

plus classiques. Bien que modeste, cette étude tend à confirmer que les déterminismes du GPD mis en évidence en conditions contrôlées soient également opérants en conditions de culture au champ.

IV Une meilleure compréhension des mécanismes fins d'absorption d'azote

La recherche de marqueurs du GPD nécessitait en amont un travail fin de description des dynamiques d'absorption post-floraison en réponse au statut azoté de la plante, et d'observation des profils transcriptomiques des gènes centraux impliqués dans l'absorption, la réduction et l'assimilation de l'azote. Ce travail a permis d'obtenir une vision plus détaillée des acteurs du métabolisme azoté du blé, et de mieux comprendre leurs régulations expressionnelles.

L'étude fine de la dynamique d'absorption d'azote post-floraison a permis de montrer que ce processus était régulé à la fois par le statut azoté et par la demande en azote exercée par les organes en croissance. La régulation de l'absorption d'azote est régie par des mécanismes réactifs, qui permettent de rétablir le statut azoté de plantes carencées en quelques jours seulement (cf. Chapitre 4 p.82), notamment au travers de la sur-expression du gène *NRT2.1* codant pour un transporteur racinaire de nitrate. Ces résultats confirment que la réponse expressionnelle de *NRT2.1* à la levée de carence azotée est comparable chez *Arabidopsis thaliana* et chez le blé (Okamoto *et al.*, 2003). Nos travaux ont également montré que les gènes centraux du métabolisme azoté étaient régulés de manière cohérente à l'échelle transcriptionnelle, suggérant que l'absorption d'azote régulait positivement l'intégralité du réseau de gènes en aval des transporteurs de la même manière que ce qui avait été précédemment observé chez d'autres espèces. Ce phénomène a été décrit comme la réponse primaire au nitrate chez *Zea mays* (Redinbaugh and Campbell, 1993) et *A. thaliana* (Hu *et al.*, 2009).

L'objet de ce travail n'était évidemment pas d'identifier fonctionnellement le signal circulant traduisant le besoin en azote de la plante. Les travaux de physiologie moléculaire montrent d'ailleurs que cette question est loin d'être résolue car la nature du signal circulant fait encore largement débat. Selon les études, ce signal est proposé être sous forme de glutamine (Vidmar *et al.*, 2000; Nazoa *et al.*, 2003; Girin *et al.*, 2007), de phytohormones (synthèse par Kiba *et al.*, 2011) ou de nitrate (Siddiqi *et al.*, 1990; King *et al.*, 1993; Wang, 2004). Nos travaux montrent clairement que, chez le blé, la concentration en nitrate des racines est, *a minima*, un marqueur intéressant de la régulation de l'absorption. Les profils de concentration en nitrate observés étaient en effet corrélés négativement aux niveaux d'expression des gènes centraux du métabolisme azoté (cf. Chapitre 4 p.88 et Chapitre 5 p.119) et permettaient de plus d'expliquer une part importante de la variabilité génétique observée.

V Des marqueurs potentiels de la concentration en protéines des grains

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif d'identifier des marqueurs physiologiques ou moléculaires du GPD potentiellement valorisables en sélection. La comparaison de deux génotypes robustement contrastés pour le GPD, mais présentant des niveaux de rendement comparables, a permis de proposer des marqueurs de ce trait. Au sein de ce couple de génotypes, du fait de leurs niveaux de rendement équivalents, le concept de GPD pouvait être confondu avec une mesure de la concentration en protéines du grain. Au niveau physiologique, nous avons observé une forte corrélation positive entre l'absorption post-floraison précoce intervenant dans les 250 °CJ après floraison et la concentration en protéines des grains à maturité. Cette observation a été confirmée en conditions de culture au champ sur une des deux variétés, conférant une robustesse à cette relation vis-à-vis de l'environnement de culture. La corrélation forte entre absorption d'azote post-floraison précoce et concentration en protéines des grains suggère que les facteurs influençant cette absorption précoce soient des marqueurs pertinents du GPD.

5.1. Croissance en biomasse des tiges après floraison

La croissance en biomasse des tiges après floraison se positionne comme un marqueur physiologique prometteur, car ce trait a été fortement corrélé à l'absorption d'azote précoce dans nos travaux (cf. Chapitre 5 p.117). Selon nos observations, le maintien d'une croissance végétative après floraison semble limiter la baisse de demande en azote de la plante intervenant entre la fin du développement végétatif et le début du remplissage actif des grains en azote. Dans la littérature ainsi que dans nos travaux, il a été clairement montré que la demande en azote de la plante était à la fois liée aux besoins en azote induits par la croissance en biomasse et par la nécessité de maintenir une concentration en azote « optimale » des tissus déjà formés (Imsande and Touraine, 1994; Gastal and Lemaire, 2002; Taulemesse *et al.*, 2015). Dans un contexte où la plante présente un statut azoté à floraison suffisant, l'absence de croissance entre la fin du développement végétatif et le début du remplissage du grain implique des besoins en azote extrêmement limités, et est accompagnée d'une absorption très faible. La poursuite de croissance en biomasse des tiges après floraison a pour effet de réduire substantiellement la durée de cette phase de faible demande pour l'azote qui semble critique dans l'établissement de la concentration en protéines et ce indépendamment du rendement. La variabilité génétique de croissance des tiges après floraison qui a été observée entre Récital et Renan au cours de ces travaux de thèse avait précédemment été référencée chez d'autres génotypes (Bertheloot *et al.*, 2008, 2012), suggérant qu'une variabilité conséquente puisse être présente dans des panels génétiques plus larges. L'hypothèse que nous proposons quant à l'impact fort du maintien d'une croissance végétative après floraison sur la concentration en protéines des grains est également supportée par des travaux récents qui se sont intéressés aux déterminismes du GPD. L'étude réalisée par Martre *et al.* (2015) sur la base de simulations de cultures à l'aide du modèle *SiriusQuality2* a abouti aux conclusions que la concentration en protéines était fortement influencée par la capacité des tiges et des feuilles à stocker de l'azote, et qu'un fort GPD était associé dans la plupart des cas à une forte absorption d'azote

après floraison. Ces résultats confirment les conclusions d'une étude plus ancienne (Martre *et al.*, 2006), qui proposait que l'absorption post-floraison soit limitée par la capacité des tiges à stocker l'azote. Ces deux études corroborent l'hypothèse qu'un maintien de croissance des tiges après floraison augmente la capacité de stockage d'azote des tiges et l'absorption d'azote post-floraison. Nos travaux affinent cette hypothèse en précisant que l'effet de cette croissance végétative post-floraison dépasse le seul effet « stock d'azote remobilisable » et est de plus associé à un maintien d'activité du métabolisme azoté favorable à la concentration en protéines des grains indépendamment du rendement.

5.2. Concentration en nitrate des racines

La concentration en nitrate des racines entre les stades floraison et floraison+250 °CJ se présente également comme un marqueur moléculaire potentiellement intéressant de l'absorption post-floraison précoce et donc de la concentration en protéines des grains. Dans le concept, cet indicateur est relativement proche de celui utilisé dans la méthode Jubil (Justes *et al.*, 1997) qui permet de guider les apports de fertilisants au cours de la phase végétative en fonction de la concentration en nitrate des jus de bas de tiges, qui traduit l'état de nutrition azotée de la plante. Cependant, tandis qu'une concentration en nitrate faible des jus bas de tiges traduit une carence azotée des plantes dans le cas de Jubil, la concentration en nitrate des racines après floraison est perçue dans notre cas comme un indicateur de la capacité de la plante à absorber de l'azote. Dans ce sens, nos travaux ont mis en évidence une forte corrélation négative entre la concentration en nitrate des racines et l'expression des gènes centraux du réseau « azote » (cf. Chapitre 4 p.88 et Chapitre 5 p.119), notamment le gène codant pour le transporteur racinaire de nitrate NRT2.1 qui joue un rôle central dans l'absorption post-floraison. Ces observations impliquent qu'en conditions non-drastiquement limitantes pour l'azote, une faible teneur en nitrate des racines est associée à une activité élevée du métabolisme azoté. La concentration en nitrate des racines se présente ainsi comme un indicateur potentiellement pertinent de l'état de satiété des plantes, conditionnant leur capacité à absorber de l'azote. Selon cette hypothèse, l'accumulation de nitrate dans les racines serait révélatrice d'une faible demande en azote de la partie aérienne, qui traduirait que la plante est à satiété. Cette accumulation de nitrates au niveau des racines régulerait négativement les gènes impliqués dans l'absorption et l'assimilation d'azote, afin de prévenir les absorptions d'azote excédentaires.

Dans nos travaux, l'observation d'un effet génétique fort sur la concentration en nitrates des racines malgré des INN comparables à floraison suggère que la demande pour l'azote après floraison puisse être liée à des niveaux de satiété génotype-dépendants (cf. Chapitre 5, p.111 et p.119). La satiété pourrait être définie comme la capacité maximale des plantes à absorber de l'azote, en accord avec la courbe de dilution maximale de l'azote proposée pour la phase végétative par Justes *et al.* (1994). Selon cette définition, la variabilité génétique de satiété implique des différences de capacité à réaliser une absorption de « luxe » qui est bénéfique aux protéines du grain (Bogard *et al.*, 2010). Conscient que la nature intégrative de l'INN est par nature différente d'une mesure instantanée d'un métabolite, la mesure de concentration en nitrate des racines à un INN donné est cependant susceptible de permettre la

caractérisation du niveau de satiété des génotypes, et d'ainsi prédire leur capacité à absorber de l'azote après floraison et à accumuler des protéines dans les grains.

5.3. Quel est le marqueur le plus pertinent ?

Les deux marqueurs proposés pour évaluer le potentiel génétique d'accumulation de protéines ne sont pas totalement indépendants. En effet, l'augmentation de biomasse des tiges après floraison a nécessairement une influence sur la concentration en nitrate des racines, car elle augmente la capacité de la plante à stocker l'azote et modifie par ce biais sa demande pour l'azote. Dans ce sens, la valeur de concentration en nitrate des racines intègre nécessairement l'effet d'une variabilité de croissance des tiges après floraison. Cependant, le marqueur de concentration en nitrate des racines n'est pas uniquement influencé par des variations de croissance des tiges, car toute variabilité de croissance en biomasse ou de seuils maximaux de concentration en azote des tissus est susceptible de l'influencer. Ce marqueur permet potentiellement d'intégrer à la fois les facteurs de croissance et de statut azoté sur l'absorption d'azote, contrairement à l'accroissement de biomasse des tiges après floraison qui, par définition, ne prédit que la variabilité d'absorption liée à des différences de croissance. Dans nos travaux, la croissance en biomasse des tiges a cependant été plus robustement corrélée à l'absorption post-floraison précoce que la concentration en nitrate des racines. Il est fort probable que la moindre corrélation observée pour la concentration en nitrate des racines vienne du fait que ce trait ait été quantifié par des mesures instantanées, qui génèrent probablement des biais, car l'absorption post-floraison précoce a elle été calculée par différence entre deux stades de développement. Cette moindre qualité de prédiction de l'absorption par la concentration en nitrate des racines privilégie *a priori* l'utilisation de la croissance en biomasse des tiges. Cependant, le nitrate racinaire, plus facilement mesurable, est aussi susceptible d'être pertinent sur des panels variétaux présentant peu de variabilité de croissance des tiges après floraison.

VI Perspectives de poursuites et de valorisation des travaux

Les résultats obtenus au cours de cette thèse, à l'interface entre recherches fondamentale et appliquée, ouvrent des perspectives à différentes échelles.

D'une part, à une échelle fondamentale, l'observation fine des dynamiques d'expression des gènes impliqués dans l'absorption et l'assimilation d'azote au cours de la phase post-floraison a permis de poser des bases intéressantes sur les mécanismes de régulation des gènes du réseau « azote ». Ces travaux peuvent présenter un point de départ pour des recherches futures visant à définir plus exhaustivement les gènes du réseau « azote » et déterminer avec plus de précision les acteurs impliqués dans leur régulation systémique.

D'autre part, à une échelle appliquée, les marqueurs physiologique et moléculaire de la concentration en protéines des grains proposés au cours de ces travaux de thèse doivent nécessairement être validés sur des panels génétiques plus larges avant d'envisager leur utilisation en sélection.

6.1. Améliorer la définition du réseau de gènes « azote » et de sa régulation systémique

La stratégie de recherche « *a priori* » que nous avons adoptée, consistant à observer les nœuds de variabilité génétique potentiels de l'absorption d'azote sur la base de la littérature, n'a évidemment pas permis d'obtenir une vision complète des processus impliqués dans l'absorption et l'assimilation d'azote. Cependant, les résultats de ces travaux incitent à penser que le modèle génique décrit chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Miller *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007; Glass, 2009; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010) soit en grande partie transposable au blé. Des différences peuvent cependant résider dans la nature des transporteurs de nitrates racinaires, qui sont susceptibles d'avoir assez largement évolué au cours de la spéciation. De ce fait, les séquences nucléotidiques codant pour ces protéines ainsi que le nombre de copies de gènes peuvent être espèce-dépendants. Les données de séquences qui demeurent encore assez limitées chez le blé ne permettent pas de statuer définitivement sur ce sujet, mais en offriront probablement l'opportunité dans un futur proche. Une description complète du modèle génique d'absorption permettra sans doute de valider ou de réfuter l'hypothèse que nous proposons sur la base des travaux présentés dans ce manuscrit, selon laquelle la variabilité allélique potentielle entre génotypes pour les gènes du réseau « azote » ne soit pas un déterminant majeur de la régulation de l'absorption. Cette hypothèse admet que les niveaux d'expression des gènes du « réseau azote » ne soient pas équivalents entre les génotypes, mais implique le fait qu'ils soient linéairement corrélés aux niveaux d'absorption d'azote. Une approche globale reposant sur la méthode RNAseq, déjà mise en œuvre avec succès chez le blé (Pellny *et al.*, 2012), est envisageable pour tester ce type d'hypothèse. Une telle approche permettrait à la fois de séquencer et de quantifier l'expression de l'ensemble des transporteurs racinaires et les gènes du réseau « azote » exprimés chez des génotypes contrastés pour l'absorption d'azote précoce après floraison.

La mesure des concentrations de certains métabolites azotés a permis de mettre en évidence la relation négative robuste existant entre la concentration en nitrate racinaire et les niveaux d'expression des gènes du réseau « azote », et particulièrement le gène *NRT2.1* codant pour un transporteur de nitrate racinaire. Ces résultats proposent le nitrate racinaire comme une molécule signal qui modulerait l'expression des gènes impliqués dans l'absorption, la réduction et l'assimilation d'azote en fonction de l'état de satiété de la plante. Cependant, il est envisageable qu'un signal circulant d'une autre nature opère dans la réponse systémique de la plante à son statut azoté, et que la concentration en nitrate racinaire ne soit qu'une conséquence de cet hypothétique signal circulant. Dans la littérature, d'autres travaux proposent l'implication de métabolites azotés comme la glutamine (Vidmar *et al.*, 2000; Nazoa *et al.*, 2003; Girin *et al.*, 2007) ou encore de phytohormones (synthèse par Kiba *et al.*, 2011) dans la régulation de l'absorption d'azote. Ces pistes restent à approfondir, car une détermination plus complète des mécanismes impliqués dans la signalisation de la satiété pour l'azote pourrait permettre de mettre en évidence des nœuds de variabilité génétique supplémentaires. Une approche métabolomique balayant un spectre large d'acides aminés à la fois dans les feuilles et dans les racines peut être envisagée pour sélectionner des molécules potentiellement impliquées dans la signalisation systémique de la satiété.

6.2. Valider les marqueurs de la concentration en protéines du grain sur des panels génétiques larges

Ces travaux de thèse ont conduit à la proposition de marqueurs physiologiques et moléculaires de la concentration en protéines du grain qui pourraient être susceptibles d'assister la sélection de génotypes sur la base du GPD. Ces marqueurs ne sont cependant qu'à un stade embryonnaire et nécessitent une validation sur un plus large panel de génotypes avant d'entrevoir leur valorisation dans les programmes de sélection.

Pour une échelle d'étude en lien avec la plante entière, l'accroissement de biomasse des tiges après la floraison peut représenter un marqueur intéressant de la variabilité génétique pour la concentration en protéines des grains. Ce trait est cependant relativement complexe à mesurer car il nécessite une estimation précise de la date de floraison ainsi que deux prélèvements destructifs successifs comprenant des mesures de matière sèche. Afin d'adapter un tel marqueur à l'expérimentation d'un panel large de génotypes, il serait raisonnable de le simplifier à une croissance en longueur des tiges après floraison, fortement influencée par la croissance post-floraison de l'entre-nœud supérieur et du pédoncule (Bertheloot *et al.*, 2012). Une expérimentation consisterait à mesurer la hauteur des plantes à floraison et floraison +250 °CJ sur un panel à base génétique large, et de croiser la valeur de croissance post-floraison des tiges avec des données de concentration en protéines des grains. Cela pourrait aussi être dans un premier temps une vingtaine de génotypes récents connus pour être des GPD négatifs ou positifs robustes, sur la base des expérimentations du GEVES qui intègre ce calcul depuis 2007. Le panel pourrait être dans un deuxième temps de type « core-collection » pour permettre des études de génétique, par exemple les 196 génotypes déjà utilisés par Bordes *et al.* (2013) qui représentent une large variabilité cultivable. L'émergence de techniques de phénotypage haut débit peut de même faciliter ce type d'approche. A titre

indicatif, il semble envisageable qu'une mesure automatique de la cinétique de hauteur moyenne des plantes pendant la période post-floraison avec une technologie de type LIDAR (Ehlert *et al.*, 2010) puisse faciliter ce type d'étude. La limite forte de telles expérimentations repose très probablement sur la précision de notation de la date de floraison, mais en explorant un panel génétique à base large et de grande taille, ce type d'approche permettrait de se positionner quant aux potentialités réelles de ce marqueur en sélection.

A une échelle moléculaire, nous proposons la concentration en nitrate des racines mesurée dans la phase précoce après floraison comme marqueur prometteur de la concentration en protéines des grains. Dans nos expérimentations conduites en conditions contrôlées, ce trait présentait de la variabilité génétique fortement corrélée aux niveaux d'expression des gènes du réseau azote, et ce malgré des valeurs d'INN comparables entre les deux génotypes expérimentés. Clairement, l'étude de ce trait sur un panel large de génotypes en conditions non-limitantes pour l'azote pourrait permettre de définir le niveau de satiété des différents génotypes, et d'ainsi prédire leur capacité à absorber de l'azote après floraison malgré un INN fort. La concentration en nitrate des racines est cependant complexe à mesurer, particulièrement dans des conditions de culture au champ où une telle mesure implique un prélèvement soigné du système racinaire. Cependant, comme la concentration en nitrate des tiges semble très représentative de la concentration en nitrate des racines (Taulemesse *et al.*, 2015), il pourrait se révéler judicieux d'utiliser la méthode Jubil (Justes *et al.*, 1997) qui offre l'opportunité de doser de manière relativement simple la concentration en nitrate des jus de bas de tiges. Une telle approche conduite sur un nombre suffisant de génotypes présentant de la variabilité pour le GPD permettrait de valider robustement l'impact génétique de la satiété sur la concentration en azote des grains.

Pour finir, il me semble que les travaux présentés dans cette thèse sont un exemple concluant de l'intérêt que peuvent prendre des approches réalisées à l'échelle de la plante entière appuyées par des approches moléculaires dans une démarche d'amélioration variétale. Bien entendu, comme déjà évoqué dans ce manuscrit, ce type d'approche ne permet pas d'établir clairement des liens fonctionnels entre processus physiologiques et/ou gènes d'intérêt. Néanmoins une approche systémique partant du caractère agronomique d'intérêt et le réduisant à ses composantes physiologiques les plus robustes semble pouvoir permettre un lien relativement direct entre recherche et sélection variétale tout en offrant des pistes pour l'identification de processus candidats pour lesquels une compréhension plus fine est nécessaire. Plus généralement ce constat rejoint le récent essor de la sélection basée sur les caractères (ou « trait based selection », Nigam *et al.*, 2005 ; Lopez *et al.*, 2012), dont le parti-pris est que l'utilisation en programmes de sélection de caractères robustement liés à l'adaptation à une contrainte donnée peut permettre un progrès génétique plus rapide qu'une sélection orientée sur la performance agronomique seule. Pour l'instant, ces approches ont été principalement utilisées en sélection pour répondre à des contraintes fortes de milieux (sécheresse, température haute). Rien n'assure que ce type d'approche soit aussi efficace dans une problématique comme la nôtre, où les conditions climatiques ne sont pas réductibles à une contrainte unique. Néanmoins je pense qu'une poursuite des travaux présentés dans ce manuscrit peut permettre d'envisager l'application de ce type de méthode à la sélection de blés productifs et de qualité.

Références

- Altenbach SB, DuPont FM, Kothari KM, Chan R, Johnson EL, Lieu D. 2003. Temperature, water and fertilizer influence the timing of key events during grain development in a US spring wheat. *Journal of Cereal Science* **37**, 9–20.
- Bertheloot J, Andrieu B, Martre P. 2012. Light–nitrogen relationships within reproductive wheat canopy are modulated by plant modular organization. *European Journal of Agronomy* **42**, 11–21.
- Bertheloot J, Martre P, Andrieu B. 2008. Dynamics of light and nitrogen distribution during grain filling within wheat canopy. *Plant physiology* **148**, 1707–1720.
- Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J-M, Jeuffroy M-H, Gate P, Martre P, Le Gouis J. 2010. Deviation from the grain protein concentration–grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4303–4312.
- Bordes J, Ravel C, Jaubertie JP, Duperrier B, Gardet O, Heumez E, Pissavy AL, Charmet G, Le Gouis J, Balfourier F. 2013. Genomic regions associated with the nitrogen limitation response revealed in a global wheat core collection. *Theoretical and Applied Genetics* **126**, 805–822.
- Ehlert D, Heisig M, Adamek R. 2010. Suitability of a laser rangefinder to characterize winter wheat. *Precision agriculture* **11**, 650–663.
- Feil B. 1997. The inverse yield–protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends in Agronomy* **1**, 103–119.
- Gastal F, Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* **53**, 789–799.
- Girin T, Lejay L, Wirth J, Widiez T, Palenchar PM, Nazoa P, Touraine B, Gojon A, Lepetit M. 2007. Identification of a 150bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1366–1380.
- Glass ADM. 2009. Nitrate uptake by plant roots. *Botany* **87**, 659–667.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* **327**, 812–818.
- Hu HC, Wang YY, Tsay YF. 2009. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *The Plant Journal* **57**, 264–278.
- Imsande J, Touraine B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* **105**, 3.
- Justes E, Mary B, Meynard JM, Machet JM, Thelier-Huche L. 1994. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* **74**, 397–407.
- Justes E, Meynard JM, Mary B, Plénet D. 1997. Diagnosis using stem base extract: JUBIL method. *Diagnosis of the nitrogen status in crops*. Springer Berlin Heidelberg, 163–187.
- Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H. 2011. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1399–1409.
- King BJ, Siddiqi MY, Ruth TJ, Warner RL, Glass AD. 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiology* **102**, 1279–1286.
- Le Gouis J, Oury FX, Lorgeou J, Senellart P. 2014. Plus de protéines grâce à la génétique aujourd'hui et demain ? Colloque blé tendre – Produire des protéines pour tous les débouchés, mardi 13 mai 2014 – Paris (France).
- Lopes MS, Reynolds MP, Jalal-Kamali MR, Moussa M, Feltaous Y, Tahir ISA, Barma N, Vargas M, Mannes Y, Baum M. 2012. The yield correlations of selectable physiological traits in a population of advanced spring wheat lines grown in warm and drought environments. *Field Crops Research* **128**, 129–136.
- Martre P, He J, Le Gouis J, Semenov MA. 2015. In silico system analysis of physiological traits determining grain yield and protein concentration for wheat as influenced by climate and crop management. *Journal of Experimental Botany*.

- Martre P, Jamieson PD, Semenov MA, Zyskowski RF, Porter JR, Tribol E.** 2006. Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 138–154.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Monaghan JM, Snape JW, Chojecki AJS, Kettlewell PS.** 2001. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica* **122**, 309–317.
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass AD, Touraine B.** 2003. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2. 1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant molecular biology* **52**, 689–703.
- Nigam SN, Chandra S, Sridevi KR, et al.** 2005. Efficiency of physiological trait-based and empirical selection approaches for drought tolerance in groundnut. *Annals of applied biology* **146**, 433–439.
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD.** 2003. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology* **44**, 304–317.
- Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Pluchard P, Rousset M, Galic N.** 2003. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program [*Triticum aestivum* L.]. *Journal of Genetics and Breeding* **57**.
- Oury FX, Godin C.** 2007. Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica* **157**, 45–57.
- Pellny TK, Lovegrove A, Freeman J, Tosi P, Love CG, Knox JP, Shewry PR, Mitchell RAC.** 2012. Cell walls of developing wheat starchy endosperm: comparison of composition and RNA-Seq transcriptome. *Plant Physiology* **158**, 612–627.
- Redinbaugh MG, Campbell WH.** 1993. Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate (evidence for an organ-specific response). *Plant Physiology* **101**, 1249–1255.
- Siddiqi MY, Glass AD, Ruth TJ, Rufty TW.** 1990. Studies of the uptake of nitrate in barley I. kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. *Plant Physiology* **93**, 1426–1432.
- Simmonds NW.** 1995. The relation between yield and protein in cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **67**, 309–315.
- Snape JW, Hyne V, Aitken K.** 1993. Targeting genes in wheat using marker-mediated approaches. *Proceedings of the Eighth International Wheat Genetics Symposium* **2**, 749–759.
- Tabbata F, Lewis S, Vouilloz JP, Ortega MA, Kade M, Abbate PE, Barneix AJ.** 2013. Effects of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm (K Gill, Ed.). *Plant Breeding* **132**, 48–52.
- Taulemesse F, Le Gouis J, Gouache D, Gibon Y, Allard V.** 2015. Post-flowering nitrate uptake in wheat is controlled by N status at flowering, with a putative major role of root nitrate transporter NRT2.1 (H Yang, Ed.). *PLOS ONE* **10**, e0120291.
- Tribol E, Martre P, Girousse C, Ravel C, Tribol-Blondel A-M.** 2006. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy* **25**, 108–118.
- Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**, 2290–2300.
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J.** 2006. A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. *Science* **314**, 1298–1301.
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD.** 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**, 307–318.

- Vogel KP, Johnson VA, Mattern PJ.** 1978. Protein and lysine contents of endosperm and bran of the parents and progenies of crosses of common wheat. *Crop Science* **18**, 751–754.
- Wang R.** 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a Nitrate Reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant physiology* **136**, 2512–2522.

I Annexe 1 : Données supplémentaires du chapitre 4

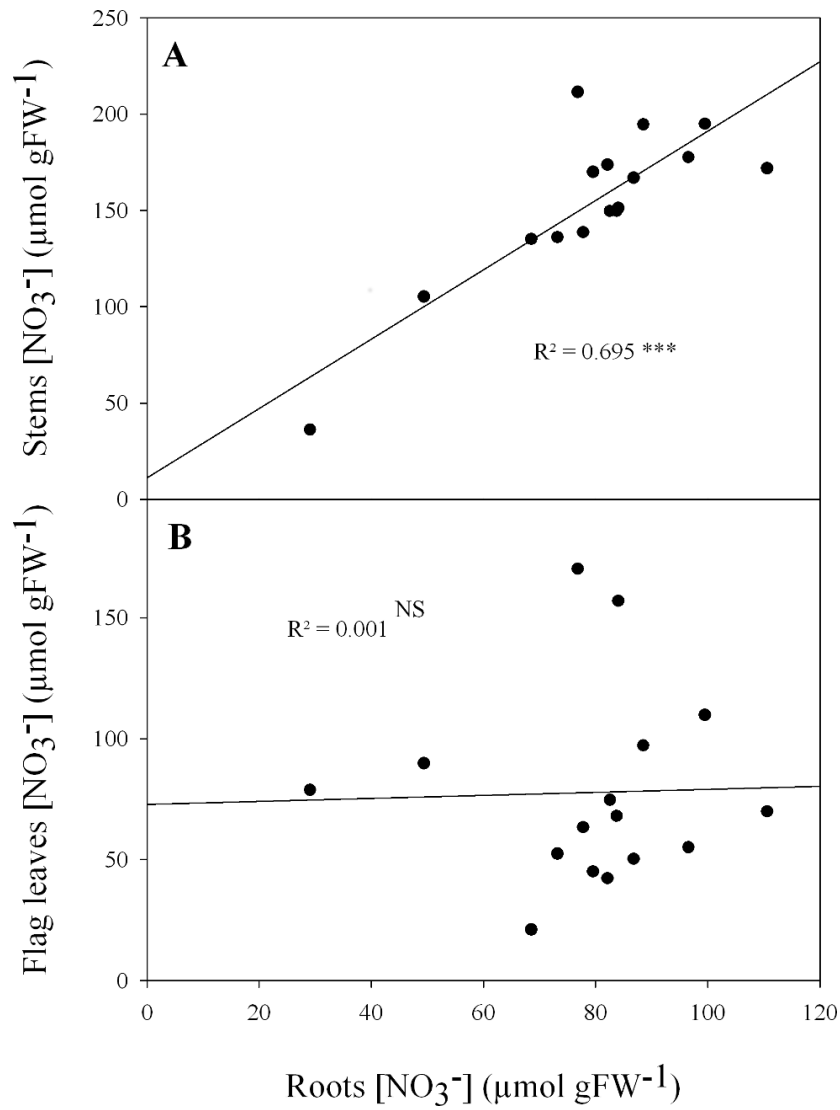
S1 Table: Elemental composition of nutrient solutions adapted from Castle and Randall (1987).

		N Treatment			
		N1	N4	N7	N10
Macroelements (mM)	KH ₂ PO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0
	KNO ₃	0,0	3,0	4,0	5,0
	Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	0,5	0,5	1,5	2,5
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	2,0	2,0	2,0	2,0
	CaCl ₂ , 2HO	3,0	3,0	3,0	2,0
	KCl	5,0	2,0	1,0	0,0
Microelements (µM)	H ₃ BO ₃	10,0	10,0	10,0	10,0
	ZnCl ₂	0,7	0,7	0,7	0,7
	CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,4	0,4	0,4	0,4
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	4,5	4,5	4,5	4,5
	MoO ₃	0,2	0,2	0,2	0,2
	EDFS-Fe	50,0	50,0	50,0	50,0

S2 Table: Target gene name, accession number and primer sequences of primer couples used in the study.

Primer pair name	Used for	Reference / Genbank accession number / Unigene contig	Primer	Sequence
TaNR	Nitrate reductase	Boisson <i>et al.</i> , 2005	Forward	CGACTGCACCGCCTTCCTCA
			Reverse	CGCCGGCGACCTTGGTG
TaNiR	Nitrite reductase	Boisson <i>et al.</i> , 2005	Forward	CCCTACACCAACCTCCTCTCCTCC
			Reverse	GTCGTTGATGTGCGGGTGCTC
TaFd-GOGAT	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	Boisson <i>et al.</i> , 2005	Forward	TGGTGCCACCCAGCGAAGA
			Reverse	AGCTCGTTTCCAGAAGATGCCTTG
TaNADH-GOGAT	NADH glutamate synthase	Boisson <i>et al.</i> , 2005	Forward	CAGTGGTCCTGCTGGTTTGGCT
			Reverse	TGCATTGTTCTCAGAACGGAGACG
TaGS2	Glutamine synthetase 2	DQ124212.1	Forward	CATACTACTGCGCCGTAGGATCAGAC
			Reverse	GGCATGACCTCCCCGTTTGTT
TaNRT1	Nitrate transporter NRT1	AY587264	Forward	GAGCTGAGGAATCACATGGCAAAAC
			Reverse	CATGAAGGCTGGCTCTGGGGT
TaNRT2.1	Nitrate transporter NRT2.1	AF332214.1	Forward	GCCGCTTGCTCTCCACGCA
			Reverse	GTCCTTGGCCATGTCTCCCTTCT
Ta54280	Translation initiation factor Su11 family protein	Ta.54280	Forward	TCTGCTGTAATGGTACTGTAGTC
			Reverse	TCCGTGAATCTTGATGCTCTC
Ta54948	Rab GTPase homolog (Rab7 subfamily)	Ta.54948	Forward	GAACGAGCCAGAGGAAGAAC
			Reverse	AAATACGGGTCCACAAGTCAC

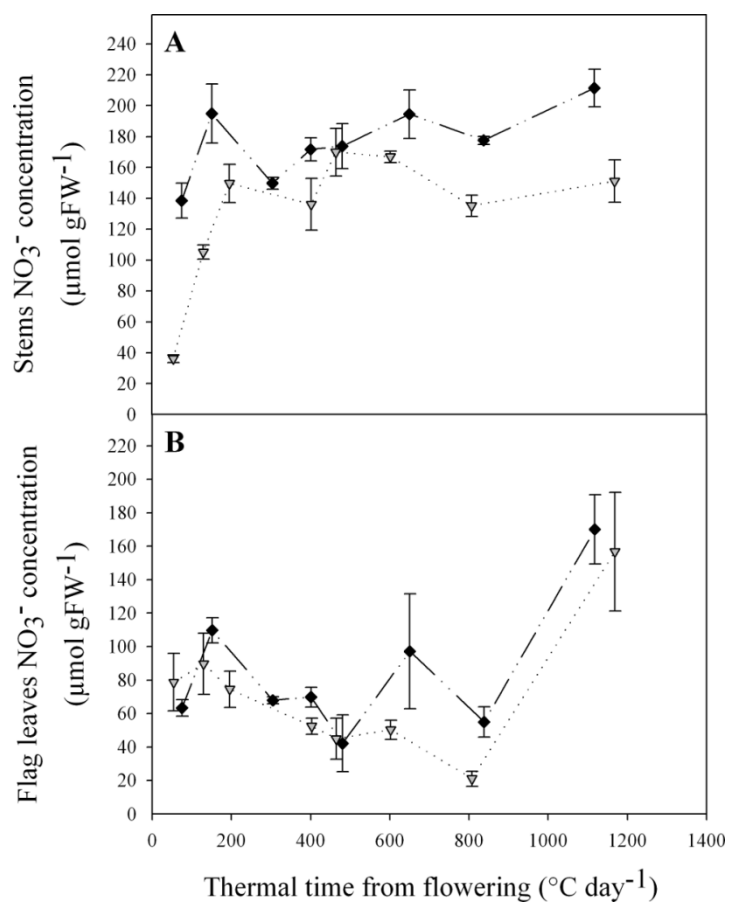
S3 Dataset: Raw data used in the study available at www.plosone.org/



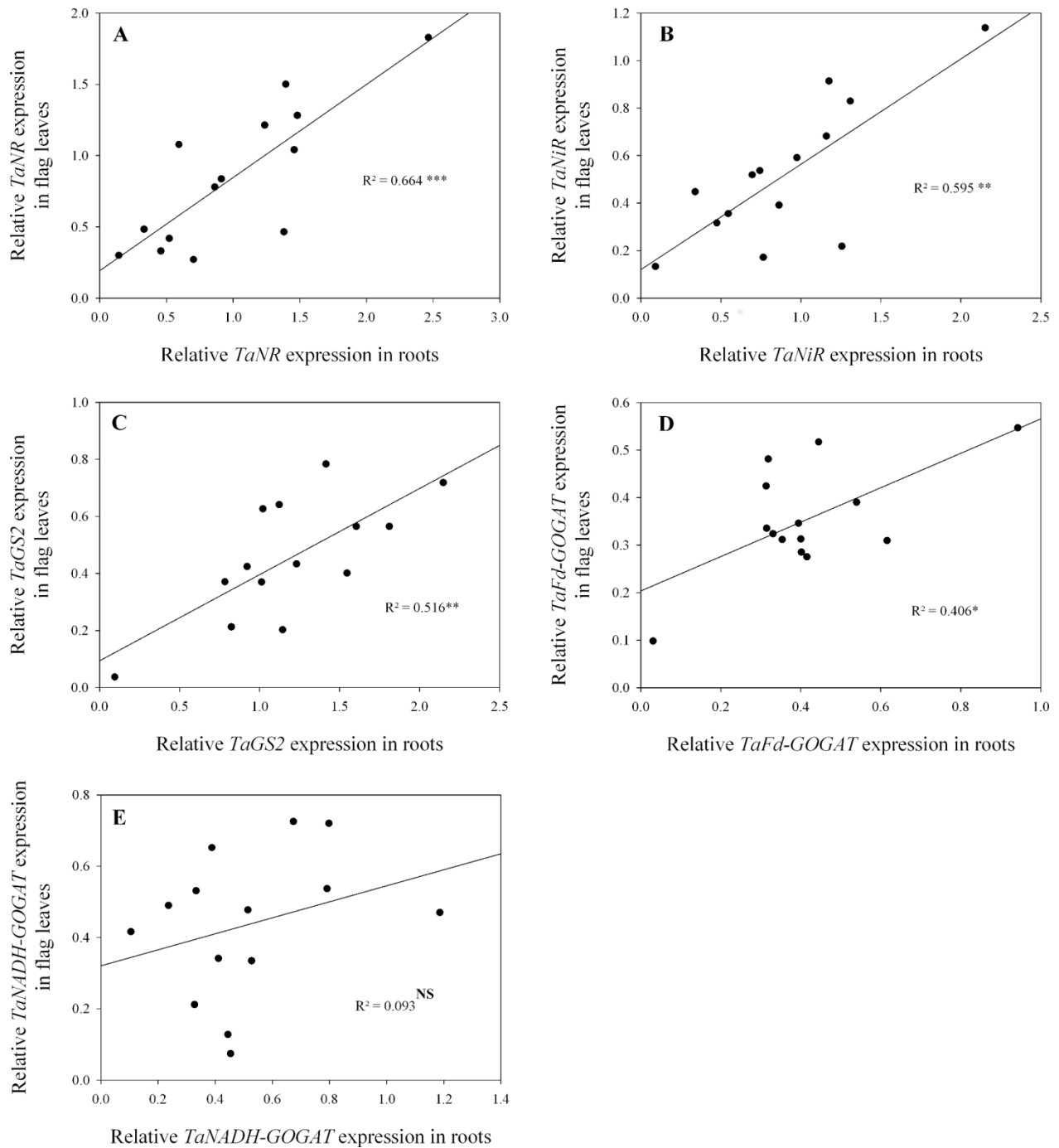
S4 Fig: Correlations of NO_3^- concentration between (A) roots and stems and (B) roots and flag leaves for two contrasted NO_3^- treatments (N4 and N10) during the post-flowering period. Values originate from two contrasted N treatments (N4 and N10) at eight post-flowering sampling dates, each including three individual biological repetitions. Statistical analyses were by the Pearson correlation test.

S5 Table: Roots, stems and flag leaves NO₃⁻ concentration at flowering for two contrasted NO₃⁻ treatments (N4 and N10). Presented values are the mean of four biological repetitions \pm 1 standard error (SE). Statistically non-significantly different groups (Tukey multiple comparisons, $p < 0.05$) are labeled with the same lowercase letter.

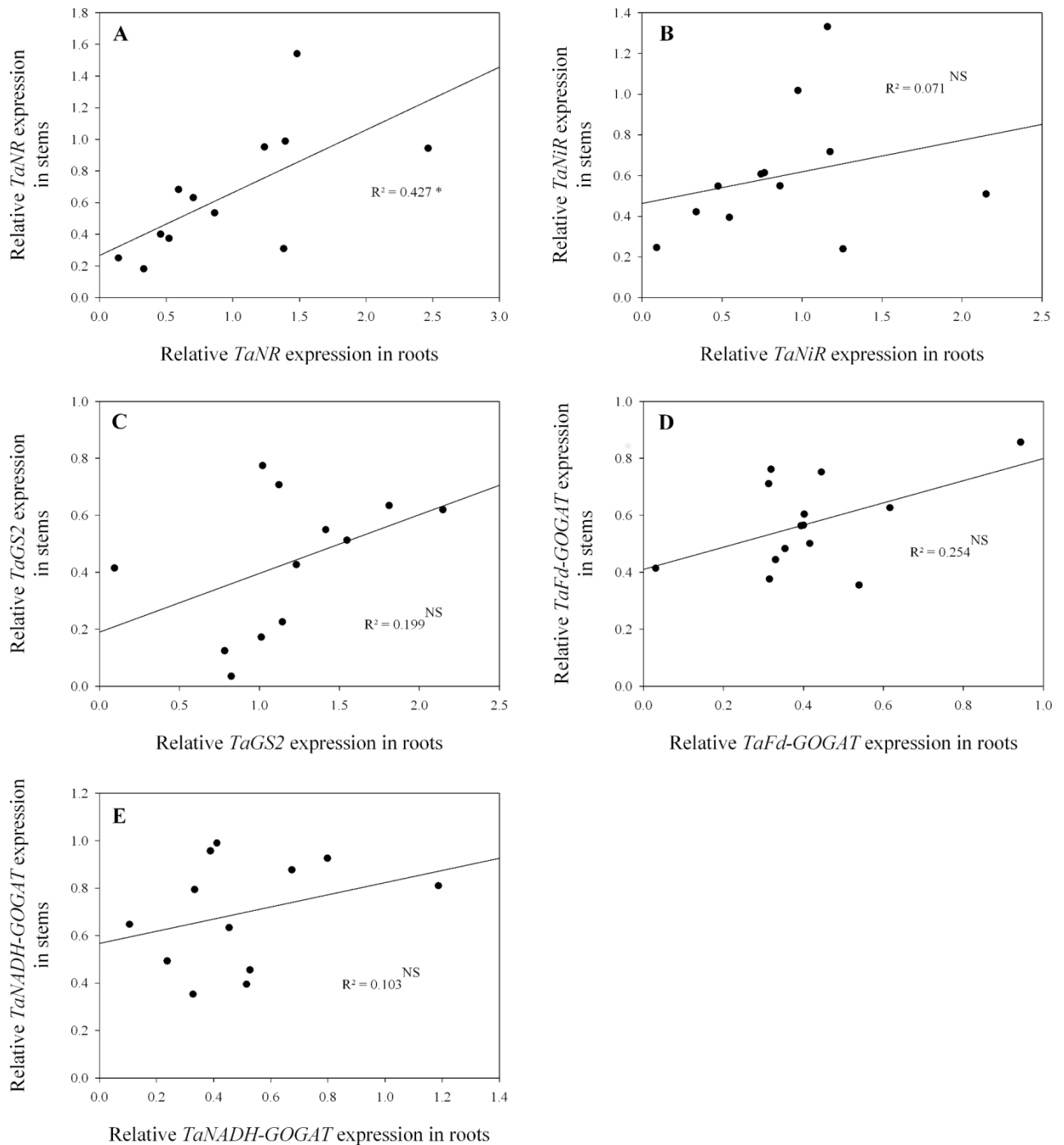
NO ₃ ⁻ treatment	Roots [NO ₃ ⁻] ($\mu\text{mol g}^{-1}$) \pm SE	Stems [NO ₃ ⁻] ($\mu\text{mol g}^{-1}$) \pm SE	Flag leaves [NO ₃ ⁻] ($\mu\text{mol g}^{-1}$) \pm SE
N4	29.09 \pm 4.22 <i>b</i>	36.16 \pm 2.49 <i>b</i>	78.78 \pm 17.15 <i>a</i>
N10	77.78 \pm 7.41 <i>a</i>	138.58 \pm 11.42 <i>a</i>	63.37 \pm 4.87 <i>a</i>



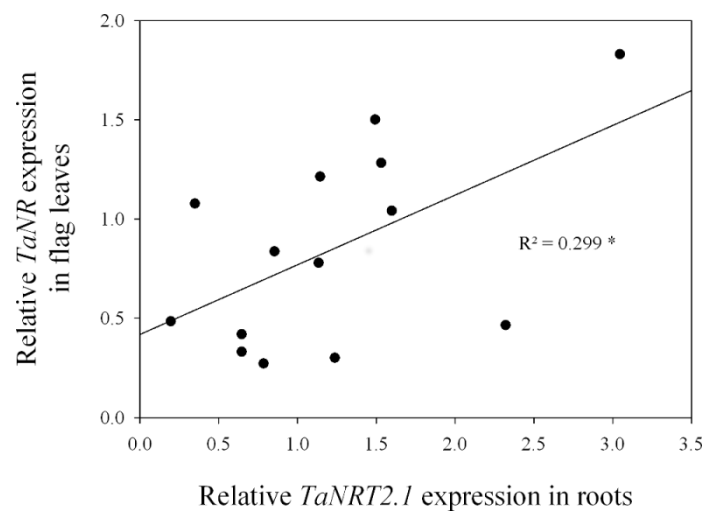
S6 Fig: NO_3^- concentration dynamics during the post-flowering period for two contrasting NO_3^- treatments (N4 and N10) in stems (A) and flag leaves (B). Values are the means of four biological repetitions ± 1 standard error for N4 (grey triangles) and N10 (black diamonds).



S7 Fig: Correlations of the relative expression levels of five genes implied in NO_3^- reduction and assimilation between roots and flag leaves for two contrasted NO_3^- treatments (N4 and N10) from flowering (GS65) to GS65+800DD. Presented relations are for *TaNR* (A), *TaNiR* (B), *TaGS2* (C), *TaFd-GOGAT* (D) and *TaNADH-GOGAT* (E). Values originate from seven post-flowering sampling dates, each including three individual biological repetitions for N4 and N10. Gene expression quantification was performed by qRT-PCR. Relative expression values were calculated using the ΔCT method corrected for primers efficiencies, using *Ta54280* and *Ta54948* as internal controls. Statistical analyses were by the Pearson correlation test.



S8 Fig: Correlations of the relative expression levels of five genes implied in NO_3^- reduction and assimilation between roots and stems for two contrasted NO_3^- treatments (N4 and N10) from flowering (GS65) to GS65+800DD. Presented relations are for *TaNR* (A), *TaNiR* (B), *TaGS2* (C), *TaFd-GOGAT* (D) and *TaNADH-GOGAT* (E). Values originate from seven post-flowering sampling dates, each including three individual biological repetitions for N4 and N10. Gene expression quantification was performed by qRT-PCR. Relative expression values were calculated using the ΔCT method corrected for primers efficiencies, using *Ta54280* and *Ta54948* as internal controls. Statistical analyses were by the Pearson correlation test.



S9 Fig: Relations between *TaNRT2.1* relative expression in roots and *TaNR* relative expression in flag leaves for two contrasted NO_3^- treatments (N4 and N10) from flowering (GS65) to GS65+800DD. Values originate from two contrasted N treatments (N4 and N10) at seven post-flowering sampling dates, each including three individual biological repetitions. Gene expression quantification was performed by qRT-PCR. Relative expression values were calculated using the ΔCT method corrected for primers efficiencies, using *Ta54280* and *Ta54948* as internal controls. Statistical analyses were by the Pearson correlation test.

N treatment	Grain number (per m ⁻²) ±SE	Thousand Kernel Weight (g) ±SE
N1	22955 ± 3443 <i>a</i>	26,24 ± 0,77 <i>a</i>
N4	30759 ± 3108 <i>a</i>	29,91 ± 1,45 <i>ab</i>
N7	50253 ± 2407 <i>b</i>	31,75 ± 1,08 <i>b</i>
N10	58808 ± 4836 <i>b</i>	28,74 ± 0,64 <i>ab</i>

S10 Table: Grain number and thousand-kernel-weight at maturity for the four NO₃⁻ treatments. Presented values are the mean of four biological repetitions ± 1 standard error (SE). Statistically non-significantly different groups (Tukey multiple comparisons, $p < 0.05$) are labeled with the same lowercase letter.

II Annexe 2 : Données supplémentaires du chapitre 5

Table S1: Elemental composition of nutrient solutions adapted from Castle and Randall (1987).

		N Treatment			
		N1	N4	N7	N10
Macroelements (mM)	KH ₂ PO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0
	KNO ₃	0,0	3,0	4,0	5,0
	Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	0,5	0,5	1,5	2,5
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	2,0	2,0	2,0	2,0
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	3,0	3,0	3,0	2,0
	KCl	5,0	2,0	1,0	0,0
Microelements (μM)	H ₃ BO ₃	10,0	10,0	10,0	10,0
	ZnCl ₂	0,7	0,7	0,7	0,7
	CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,4	0,4	0,4	0,4
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	4,5	4,5	4,5	4,5
	MoO ₃	0,2	0,2	0,2	0,2
	EDFS-Fe	50,0	50,0	50,0	50,0

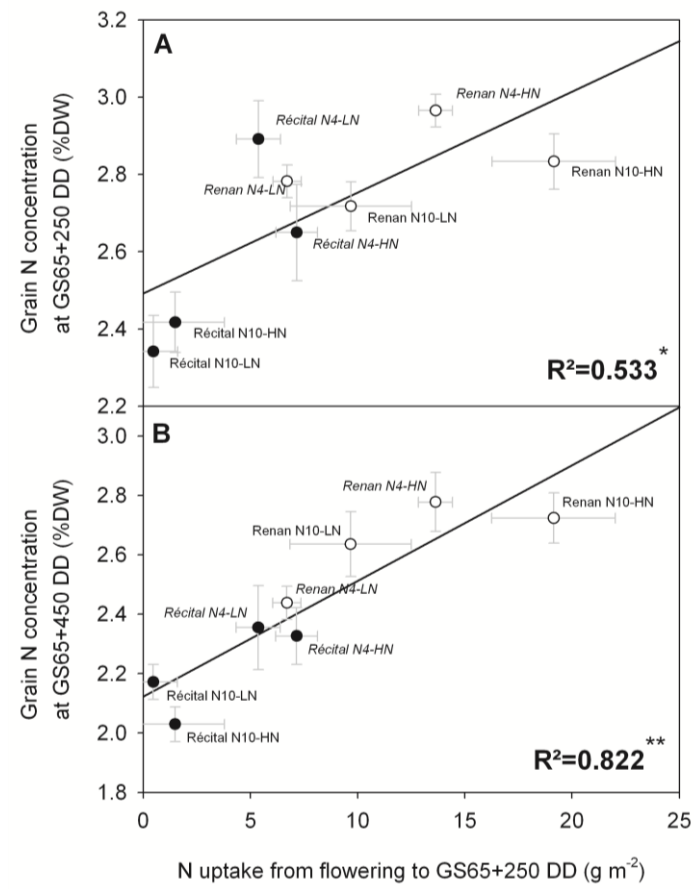


Figure S1: Relation between N uptake from flowering to GS65+250 DD and grain N concentration at GS65+250 DD (A) or at GS65+450 DD (B). Values are for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with the two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error.

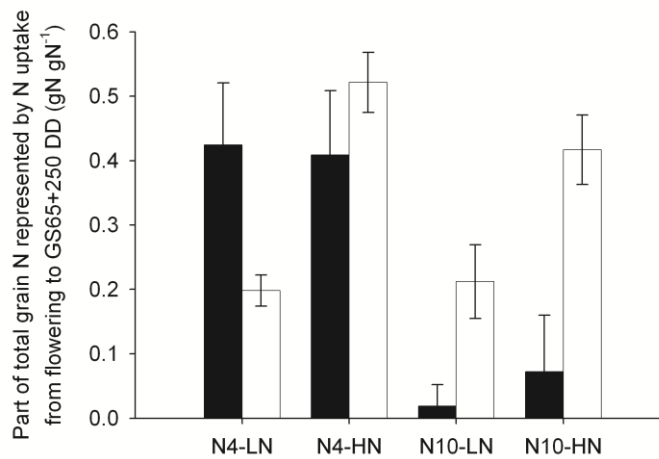


Figure S2: Proportion of total grain N at maturity represented by N uptake from flowering to GS65+250 DD. Values are for Réctal (black bars) and Renan (white bars) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 and N10 combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error.

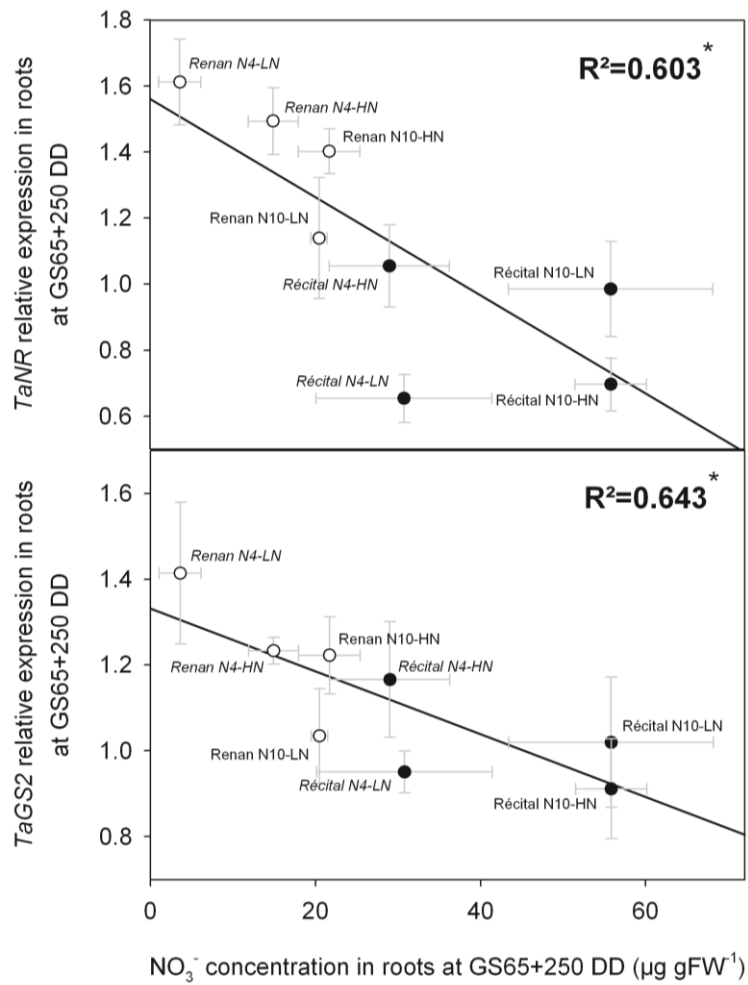


Figure S3: Relations between nitrate concentration and *TaNR* relative expression (A) or between nitrate concentration and *TaGS2* relative expression (B) in roots at GS65+250 DD. Values are for Récital (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates ± 1 standard error.

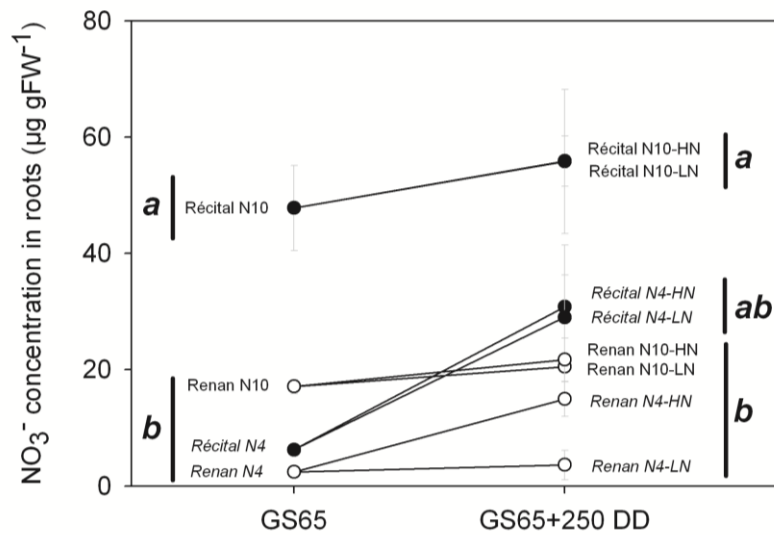


Figure S4: Nitrate concentration in roots at flowering and at GS65+250 DD. Values are for Réctal (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (italic labels) and N10 (regular labels) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates \pm 1 standard error. Statistical groups are given by post-ANOVA Tukey HSD test for $\alpha=0.05$.

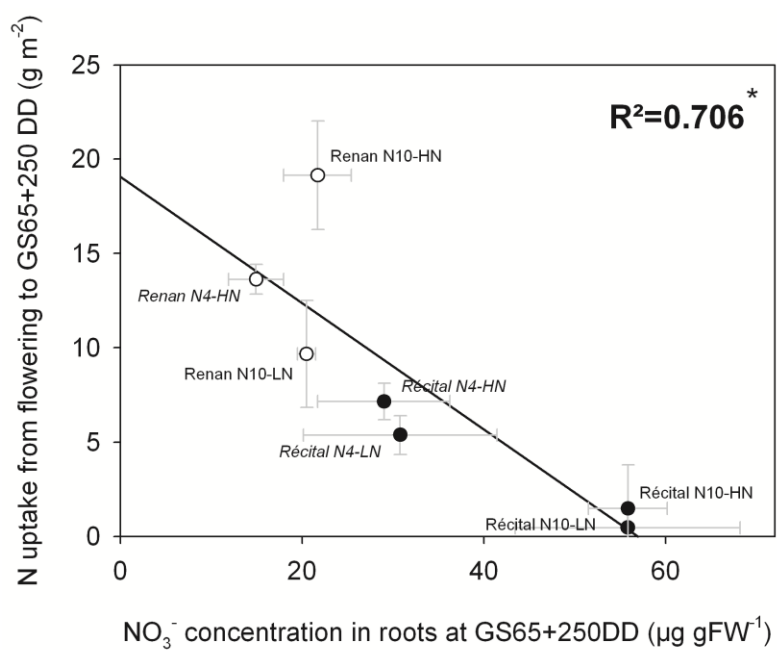


Figure S5: Relations between nitrate concentration in roots at GS65+250 DD and N uptake from flowering to GS65+250 DD. Values are for Récltal (black circles) and Renan (white circles) exposed to two contrasting pre-flowering nitrate treatments N4 (*italic labels*) and N10 (*regular labels*) combined with two contrasting post-flowering nitrate treatments LN and HN. Values are the means of five biological replicates ± 1 standard error.